

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Papel de anosmina-1 en la neurogénesis del
sistema olfativo durante el desarrollo y en un
modelo de sobreexpresión en ratón transgénico**

DIEGO GARCÍA GONZÁLEZ

TOLEDO 2012

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**“Papel de anosmina-1 en la neurogénesis
del sistema olfativo durante el desarrollo
y en un modelo de sobreexpresión en
ratón transgénico”**

Diego García González

Director de tesis: Dr. Fernando de Castro Soubriet

Grupo: Neurobiología del desarrollo

Centro: Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo





FERNANDO DE CASTRO SOUBRIET, Investigador Principal del grupo Neurobiología del Desarrollo (GNDe) del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA que el presente trabajo titulado **“Papel de anosmina-1 en la neurogénesis del sistema olfativo durante el desarrollo y en un modelo de sobreexpresión en ratón transgénico”**, ha sido realizado bajo mi dirección por **D. Diego García González** en el Grupo Neurobiología del Desarrollo del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Dicho trabajo reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que así conste, lo firmo en Toledo a 09 de Noviembre del 2012

Fdo. Fernando de Castro Soubriet

AGRADECIMIENTOS

Hay quien dice que ésta es la parte más complicada de una tesis. En realidad, yo creo que es la más sencilla.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Fernando, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y de asomarme al mundo de la investigación. Tu puerta siempre ha estado abierta para cualquier tipo de problema, me has dado tu apoyo y confianza y me has ayudado a mejorar. En esta confianza había un gran margen de libertad y me has permitido hacer de todo, pero también de responsabilidad. Así, he cometido muchos errores, pero también he reflexionado y aprendido mucho más. Te doy las gracias en todo el sentido de la palabra porque he aprendido mucho de ti, a través de nuestras discusiones o de tu forma de actuar.

Cuando hago un balance global y evalúo lo vivido en estos años, con sus momentos buenos y malos, me doy cuenta de que he sido un afortunado en toda regla por poder dedicarme a la investigación, por poder, al fin y al cabo, divertirme y jugar. No digo que haya sido siempre fácil, pero desde luego que merece la pena porque no consigo imaginarme otra actividad más apasionante y que ofrezca tantos atractivos.

También quiero agradecer a todas las personas del laboratorio, los que están y los que se fueron, que me hayáis aguantado durante todo este tiempo. A Isa, Laura, Mely, Jacinto, Iris, Isa, Rafa, Virginia, Javi, Ana, Pedro, Diego, Yoda, Eva, Cris, Vero III y Vero: de todos he aprendido. Parece la lista de los reyes godos... Sabéis que os debo muchísimo por vuestra ayuda (unos me habéis sufrido más que otros), vuestros ánimos, por las charlas, los cafés, los viajes al baño... Es difícil plasmar aquí tantas cosas, lo sabéis. Hicisteis mucho más de lo necesario, de lo estrictamente profesional. Sabéis que vuestra ayuda me ha salvado la vida unas cuantas veces a lo largo de estos años. Mil gracias, de verdad. Sólo espero que os quede algo mío: visca el Barça!

Fuera del labo, no me puedo olvidar de José Ángel, Ángela y Javi Mazarío. Las largas sesiones en microscopía (mi segunda casa en el hospital) no habrían igual sin vosotros, las risas, los cafés y las charlas. Y de todos los demás compañeros del centro.

A Jorge, Marisa, Jaime, Ale, Carmen, David, Axel, Arantxa, Javi, Maño, Kuo... Unos aquí y otros allá. Todos más que amigos. Os quiero.

A mi familia y, sobre todo, a mis padres. No hay palabras para contarlo. Vuestro amor, cariño, ayuda, paciencia para aguantarme (porque hay que tenerla...) han sido tan grandes, que sin vosotros, sin vuestra educación, sin todos estos años de esfuerzo para que me convierta en una mejor persona, no habría sido posible nada de esto. Os debo todo porque todo me lo habéis dado.

A mis padres, por todo.

*Volando voy, volando vengo,
Por el camino yo me entretengo.*

Kiko Veneno

El caos es un orden por descifrar.

José Saramago

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BDA	Dextranamina biotinilada
BO	Bulbo olfativo
BOA	bulbo olfativo accesorio
CHO	Células de ovario de hamster chino
CB	Calbindina
CC	Cuerpo calloso
CCG	Capa de células granulares
CM	Capa de células mitrales
CG	Capa glomerular del bulbo olfativo
CNO	Capa del nervio olfativo
CO	Corteza Olfativa
CPE	Capa plexiforme externa
CPG	Células periglomerulares
CPI	Capa plexiforme interna
CR	Calretinina
Cx	Corteza cerebral
Dcx	Doblecortina
DIV	Días in vitro
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGM	Eminencia ganglionar medial
EGL	Eminencia ganglionar lateral
EO	Epitelio olfativo

Est Estriado

FGF Factor de crecimiento fibroblástico

FBS Suero fetal bovino

GABA Ácido γ -aminobutírico

GDNF Factor neurotrófico derivado de glía

GFAP Proteína glial fibrilar ácida

GFP Proteína fluorescente verde

GnRH (Neuronas) liberadoras de hormonas gonadotropinas

HBSS Solución salina equilibrada de Hanks

HGF Factor de crecimiento hepatocítico

LCR Líquido cefaloraquídeo

NG2 Antígeno neuronal glial 2

NVSs Neuronas sensoriales vomeronasales

PB Tampón fosfato

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PFA Paraformaldehído

PV Parvalbúmina

RO Receptor olfativo

RMS Ruta de migración rostral

RT-PCR Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

SNC Sistema nervioso central

SNP Sistema nervioso periférico

SOP Sistema olfativo principal

SOVN Sistema vomeronasal

SVZ Zona subventricular

TH Tirosina Hidroxilasa

TOL Tracto olfativo lateral

VL Ventrículo lateral

VO Ventrículo olfativo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. EL SISTEMA OLFATIVO	3
A.Estructura general del sistema olfativo	3
B. Organizacion topografica entre las proyecciones del epitelio y el bulbo olfativos	5
C. Conexiones del BO a la corteza olfativa	6
D. Breve descripcion del desarrollo del sistema olfativo	8
E. Papel de la glia radial durante el desarrollo del SNC.....	9
F. La neurogenesis en el sistema olfativo adulto	10
G. Factores reguladores de la neurogenesis en al SVZ del adulto.....	12
a. El endimio, el liquido cefalorraquideo y el cilio primario	14
b. La vasculatura y la ECM	15
H. La RMS y la migración	16
I. Estructura general del BO y diferenciación de las interneuronas	17
a. Celulas granulares (CG).....	17
b. Celulas periglomerulares (CPG)	18
c. Origen de las interneuronas del BO	19
II. EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 2 (FGF2) Y SUS RECEPTORES.....	21
III. LA MATRIZ EXTRACELULAR Y ANOSMINA-1.....	23
A. La matriz extracelular.....	23
B. Anosmina-1	24
a. El gen KAL1	24
b. Expresion de KAL1 y anosmina-1. Regulacion de la expresion del gen KAL1.	25
c. Mecanismos de accion de anosmina-1	26
d. Efectos biologicos de anosmina-1	27
1. Anosmina-1 en la migracion celular.....	27
2. Crecimiento axonal y formacion de colaterales.....	28
3. Efectos de anosmina-1 en otros vertebrados	28
4. Funciones de anosmina-1 en invertebrados	29
e. Implicación de anosmina-1 en enfermedades.....	30
1. Anosmina-1 en el sindrome de Kallmann	30
2. Anosmina-1 en otras enfermedades.....	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIALES Y METODOS	39
I. Modelo animal y su manipulaci3n	41
A. JUSTIFICACION DEL MODELO.....	41
B. DESARROLLO DE LA RATA Y DEL RATON	41
C. PROCEDENCIA Y CONDICIONES DE CRIA	41
D. GENERACION DEL RATON TRANSGENICO DE SOBREEXPRESION DE ANOSMINA-1.....	41
II. Histologia	42
A. PROCEDIMIENTO GENERAL.....	42
B. INYECCIONES DE BrdU.....	44
C. CUANTIFICACIONES ESTEREOLOGICAS	44

D. MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	45
E. DISECCION WHOLE-MOUNT DE SVZ, INMUNOMARCAJE Y MICROSCOPIA.....	45
III. Cultivos in vitro	46
A. Explantes de SVZ y co-cultivos con agregados de celulas CHO	46
B. Ensayos de proliferación	47
C. Ensayos de quimiotaxis	48
D. Ensayos de adhesión.....	49
IV. Analisis de expresion genica por PCR semicuantitativaen tiempo real (qRT-PCR)	49
V. Analisis de expresion de proteinas por Western blotting	50
VI. Inyecciones de trazadores y estudio del TOL.....	50
VII. Experimentos de comportamiento.....	51
A. Discriminacion espontanea de odorantes sinteticos.	51
B. Memoria olfativa a corto plazo.	51
VIII. Cuantificaciones y analisis estadístico	52
RESULTADOS.....	55
I. FGF2 y anosmina-1 se encuentran expresadas en la SVZ y la RMS	57
II. FGF2 induce in vitro la migracion de los neuroblastos de SVZ pre- y postnatalmente	60
III. Anosmina-1 posee un efecto quimioatrayente sobre neuroblastos de SVZ pre- y postnatalmente in vitro.....	62
IV. Estudio de los receptores de FGF2 y anosmina-1 en la migracion de neuroblastos de SVZ	63
V. FGF2 aumenta la proliferación en la SVZ de células de estirpe no neuronal	64
VI. Generacion de la linea de ratones transgenicos de sobreexpresion de anosmina-1	65
VII. La sobreexpresion de anosmina-1 afecta a la funcion olfativa	66
VIII. La sobreexpresion de anosmina-1 altera la densidad de interneuronas en el BO	68
IX. La sobreexpresion de anosmina-1 no cambia el tracto olfativo lateral (TOL)	71
X. La sobreexpresion de anosmina-1 produce cambios morfologicos en la SVZ	72
XI. Las celulas B, su cilio primario y las celulas endodiales expresan FGFR1 en la SVZ.....	75
XII. La sobreexpresion de Anosmina-1 estimula la neurogenesis en la SVZ in vivo	76
XIII. La sobreexpresion de anosmina-1 incrementa la migracion de neuroblastos in vitro	77
DISCUSIÓN.....	83
I. Anosmina-1, proteina de ECM, interviene en un amplio rango de procesos en el SNC	85
II. Anosmina-1 en la neurogenesis de la SVZ	86
III. El papel de las celulas ciliadas en la SVZ	87
IV. El complejo anosmina-1-FGF2-FGFR1 interviene en la migracion de los neuroblastos de SVZ.....	89
V. La sobreexpresion de anosmina-1 altera las densidades de interneuronas del BO	92
VI. La neurogenesis y su significado funcional.....	94
CONCLUSIONES.....	101
REFERENCIAS	107
ANEXOS	123

INTRODUCCIÓN

I. EL SISTEMA OLFATIVO

El sentido del olfato representa un papel esencial en la función sensorial de los animales y lo largo de su evolución. Los sistemas sensoriales implicados en la quimiorrecepción en vertebrados se han especializado y diversificado siguiendo una relación dependiente con las condiciones ecológicas en que se encuentran los animales a lo largo de su ontogenia y filogenia, especializándose en la percepción de moléculas químicas implicadas en distintos contextos del comportamiento: mientras que los odorantes ambientales permiten a los animales encontrar comida, peligros potenciales y sitios para la cría, los olores producidos por otros individuos (conocidos como feromonas), intervienen en comportamientos socio-sexuales, tales como el establecimiento de jerarquías o estatus reproductivos, y en el reconocimiento de individuos y grupos (Ache and Young, 2005). Tradicionalmente, estos dos sistemas han sido considerados separadamente desde un punto de vista funcional y anatómico, implicados en el procesamiento en paralelo de grupos independientes de moléculas mediante patrones de conexiones distintos en el telencéfalo. En consecuencia, se hizo la distinción de que los olores ambientales eran procesados exclusivamente por el sistema olfativo principal (SOP) y las feromonas por el sistema vomeronasal (SOVN). Por lo tanto, el concepto de “olfacción dual” hacía referencia a estos dos caminos aparentemente independientes a la hora de procesar los distintos estímulos y dar lugar, en consecuencia, a diversos tipos de comportamientos (Baum and Kelliher, 2009; Brennan and Zufall, 2006; Scalia and Winans, 1975; Winans and Scalia, 1970). Sin embargo y a pesar de sus diferencias anatómicas y funcionales, numerosos trabajos recientes sugieren con firmeza que ambos sistemas funcionan de modo sinérgico en la regulación de un rango de comportamientos determinados por el olfato, que van desde la búsqueda de comida y contextos de defensa hacia las interacciones sociales y reproductivas, mostrando un cierto grado de solapamiento en algunas de sus proyecciones centrales (para revisiones específicas sobre el tema: Ache and Young, 2005; Baum, 2012; Dulac and Torello, 2003).

A. Estructura general del sistema olfativo

En la mayoría de los vertebrados, la estructura general del sistema olfativo puede describirse del siguiente modo:

En el SOP, las neuronas sensitivas olfativas (NSOs) localizadas en el techo de la cavidad nasal, sobre todo en el epitelio olfativo (OE), junto con dos regiones adicionales conocidas como el ganglio de Grüneberg y el órgano septal, proyectan al neuropilo glomerular del bulbo olfativo (BO; **Figura 1A**; Fleischer and Breer, 2010). El EO consiste en múltiples plegamientos laminares del neuroepitelio, desarrollado a partir de la placoda olfativa durante la embriogénesis, donde las moléculas volátiles son atraídas durante la respiración pasiva o el olisqueamiento activo hasta hacer contacto con la mucosa. Cada NSO, que expresa un único gen receptor olfativo (RO), extiende

múltiples cilios dentro de la capa mucosa que cubre la superficie laminar del neuroepitelio. La activación de los ROs, acoplados a proteínas $G_{\alpha\text{olf}}$, dispara una cascada de señalización intracelular de AMPc, que conduce tanto a la activación de canales de cloro dependientes de calcio, como de canales activados por nucleótidos cíclicos (Mombaerts, 2004). Existen millones de NSOs en el EO y cada una de ellas expresa sólo uno de los 1.000 ROs que, aproximadamente, hay descritos en lo que constituya la mayor familia de genes del genoma de los mamíferos (Buck y Axel, 1991). De este modo, las NSOs que expresan un mismo receptor (unas 5.000-10.000 neuronas en roedores) envían sus axones a un solo glomérulo de cada BO (de Castro, 2009; Martínez-Marcos, 2009; Ressler et al., 1994; Strotmann, 2001; Strotmann et al., 2004; Vassar et al., 1994). Así, cada uno de los cerca de 2.000 glomérulos del BO representa proyecciones convergentes de NSOs que expresan un mismo RO y que son inervados por la dendrita apical de una única célula mitral o empenachada (Mombaerts, 2006). Por tanto, cada célula mitral representa la activación de un único tipo de RO y, tras un procesamiento horizontal mediante interneuronas periglomerulares y granulares principalmente, proyecta a las diversas estructuras telencefálicas que, conjuntamente, se conocen como la corteza olfativa (CO; **Figura 1B**; Luo y Katz, 2004).

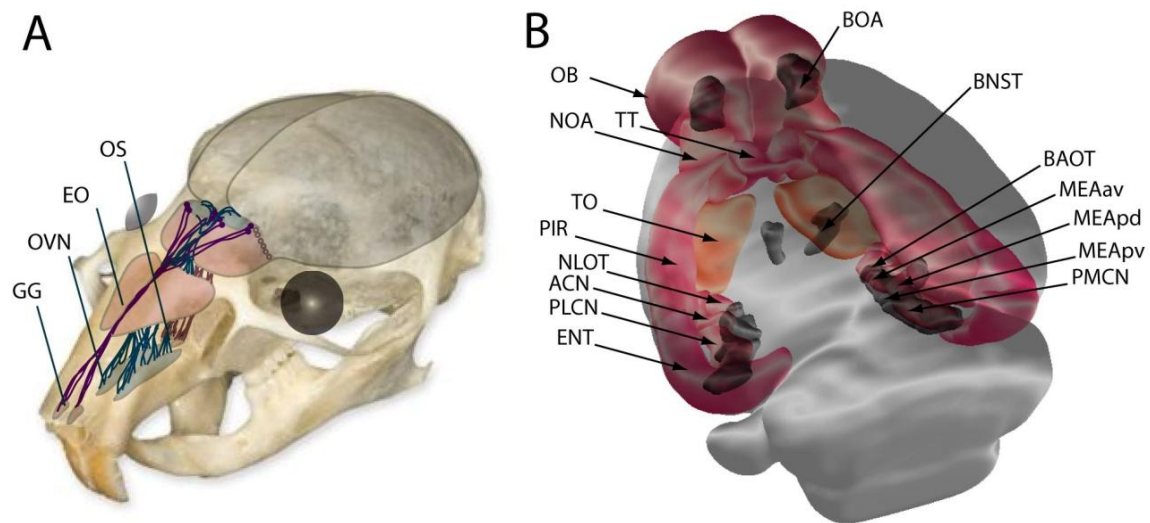


Figura 1. Esquema general del sistema olfativo principal (SOP) y vomeronasal (SOVN) en ratones. (A) Las NSOs se encuentran en el epitelio olfativo (EO), ganglio de Grüneberg (GG) y órgano septal (OS) en la cavidad nasal, desde donde proyectan al bulbo olfativo (BO). Las neuronas del SOVN se encuentran en el órgano vomeronasal (OVN) y mandan proyecciones axonales al bulbo olfativo accesorio (BOA). **(B)** Esquema de las proyecciones centrales del BO (rosa y naranja), que terminan en el núcleo olfativo anterior (NOA), tenia tecta (TT), tubérculo olfativo (TO), corteza piriforme (PIR), núcleo del tracto olfativo lateral (NLOT), núcleo cortical anterior (NCA) y núcleo posterolateral cortical (PLCN) de la amígdala y corteza entorrinal (ENT). Las proyecciones centrales del SOVN se representan en gris oscuro: el BOA proyecta al tracto olfativo accesorio (BAOT), la amígdala medial anteroventral (MEAav), posterodorsal (MEApd), posteroventral (MEApv) y al núcleo cortical posteromedial (PMCN). Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

Por otro lado, el órgano vomeronasal (OVN) es una estructura tubular con un extremo cerrado, situada bilateralmente en la base del septo nasal, que se abre a la boca y/o a los orificios nasales, permitiendo el influjo de fluidos que contienen feromonas (Meredith et al., 1980). Las neuronas sensoriales vomeronasales (NSVs) exponen sus microvellosidades al lumen del OVN, donde se expresan diferentes paquetes de receptores acoplados a proteínas G, los V1R o V2R, asociados bien a proteínas $G_{\alpha i2}$ o $G_{\alpha o}$ y proyectan a regiones rostrales o caudales del bulbo olfativo accesorio (BOA), respectivamente (**Figura 2A**; Berghard y Buck, 1996; Buck, 2000; Dulac y Axel, 1995; Dulac y Wagner, 2006; Herrada y Dulac, 1997; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997). La transducción de señales sensoriales moviliza la activación de la cascada de señalización IP3/DAG y de canales TRPC2 (Zufall, 2005). Las NSV de los subdominios apical o basal del OVN expresan, aproximadamente, una proteína receptora de 200 genes V1R o de 80 genes V2R, respectivamente. Sin embargo, en el BOA, cada NSV proyecta a 6-30 glomérulos y cada célula mitral inerva de 3 a 9 glomérulos a partir de neuronas que expresan, bien el mismo o bien receptores muy próximos genéticamente (**Figura 2B-C**; Belluscio et al., 1999; Del Punta et al., 2002; Larriva-Sahd, 2008; Rodríguez et al., 1999; Wagner et al., 2006).

B. Organización topográfica entre las proyecciones del EO y el BO

Como en los demás sistemas sensoriales, las conexiones axonales en el sistema olfativo, desde la periferia al sistema nervioso central (SNC) no suceden al azar y su formación sigue un patrón establecido.

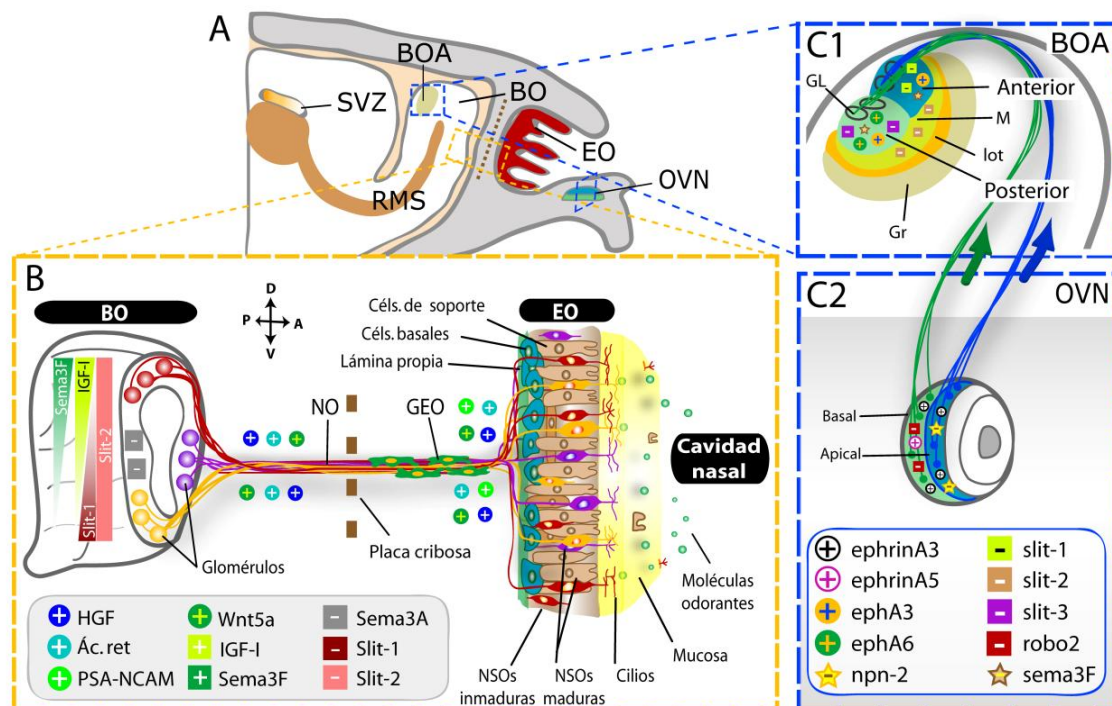


Figura. 2. Conectividad de EO/OVN a BO/BOA y principales moléculas implicadas en la formación de los nervios olfativo y vomeronasal y del TOL. (A) Sección sagital de la cabeza de un ratón en el que se representan las estructuras olfativas. El panel B muestra la conectividad entre el EO y el BO, donde cada NSO expresa un único gen receptor olfativo y los axones de las células que lo expresan convergen en uno o unos pocos glomérulos en el BO. Las moléculas secretadas desde el BO forman el NO y son representadas como “+” cuando atraen o promueven el crecimiento axonal, y como “-” cuando lo repelen o inhiben. Los gradientes espaciales de IGF-1, Sema3A, Sema3F y Slit-1 son cruciales para dirigir correctamente a los axones hacia sus zonas de destino en el BO. Los paneles C1 y C2 muestran en detalle el OVN y el BOA y sus conexiones específicas, con una representación espacial por capas de las moléculas implicadas en el proces. Abreviaturas: BO, bulbo olfativo; BOA, bulbo olfativo anterior; EO, epitelio olfativo; GEO, glía envolvente olfativa; NO, nervio olfativo; NOA, núcleo olfativo anterior; NSO, neurona sensitiva olfativa; OVN, órgano vomeronasal; RMS, ruta migratoria rostral; SVZ, zona subventricular; TOL, tracto olfativo lateral. Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

Los odorantes son moléculas aromáticas volátiles con diversas propiedades químicas que confieren una capacidad variable de difusión en el aire, al igual que dentro de la mucosa del EO. La expresión de un único RO por las NSOs se basa en el sistema de exclusión alélica, representando un evento clave en la biología del sistema olfativo al asegurar que cada neurona sea receptora de un repertorio definido de ligandos (Buck y Axel, 1991). Las NSOs que expresan los mismos genes de ROs se encuentran distribuidas en restringidas bandas longitudinales del EO que varían en su posición dorsoventral (Iwema et al., 2004; Miyamichi et al., 2005; Ressler et al., 1994; Strotmann et al., 1994; Vassar et al., 1994). Inicialmente, se describieron sólo cuatro zonas de expresión restringida de estos ROs (Ressler et al., 1994; Strotmann et al., 1994; Vassar et al., 1994), aunque estudios más recientes han reconocido que, más que zonas con distintos límites, existen dominios continuos en los que se producen solapamientos únicos para cada RO (Iwema et al., 2004; Miyamichi et al., 2005). Esta organización regional consistiría en un mosaico topográfico en el EO que parece mantenerse en el BO (Ressler et al., 1994; Saucier y Astic, 1986; Schoenfeld et al., 1994; Vassar et al., 1994). De este modo, las NSOs situadas en la cavidad nasal dorsal convergen y forman glomérulos en el BO dorsal, y de manera análoga ocurre en la parte ventral. Así, cada una de las cuatro zonas principales del EO estaría representada en el BO, habiendo también gradientes y zonas solapantes en BO (Miyamichi et al., 2005).

C. Conexiones del BO a la corteza olfativa

Las proyecciones del BO y del BOA son marcadamente diferentes (**Figuras 1B y 3**). El BO proyecta al núcleo olfativo anterior, tenia tecta, tubérculo olfativo, corteza piriforme, núcleos amigdaloides anterior y posterolateral y a la parte lateral de la corteza entorrinal. Todas estas proyecciones forman los tractos olfativos medial y lateral (TOL), los cuales también contienen eferentes desde el BOA (**Figuras 1B y 3**; de Castro, 2009; Martínez-Marcos, 2009; Shipley y Adamek, 1984). Los axones de las células mitrales proyectan ampliamente hacia la corteza olfativa (CO), incluida la corteza piriforme, mientras que los axones de las células empenachadas proyectan a estructuras más rostrales, incluyendo la porción anterior de la corteza piriforme

(Haberly y Price, 1977; Nagayama et al., 2010). Las eferentes terciarias desde las estructuras de la CO pueden resumirse de la siguiente manera: la corteza piriforme proyecta al núcleo endopiriforme (conectado a su vez, con la amígdala vomeronasal o medial), la corteza entorrinal proyecta principalmente al hipocampo (constituyendo la vía perforante), y la amígdala olfativa proyecta al núcleo vomeronasal amigdalino (Kang et al., 2009; Martínez-Marcos, 2009). El SOVN parece preservar cierta segregación entre áreas del BOA que reciben aferentes desde las NSVs que expresan distintos receptores vomeronasales y sus proyecciones telencefálicas (Martínez-Marcos, 2009; Mohedano-Moriano et al., 2007). Los núcleos receptores de proyecciones del BOA envían sus proyecciones exclusivamente a otras estructuras del sistema vomeronasal (incluido el BOA) y el núcleo hipotalámico, con escasas fibras a partir de la amígdala posteromedial para hacer sinapsis con la formación hipocampal, además de al núcleo subcortical amigdalino (**Figura 1B**; Kang et al., 2011; Martínez-Marcos, 2009; Scalia y Winans, 1975; Shipley y Adamek, 1984; Winans y Scalia, 1970). De este modo, se produce un algo grado de integración de proyecciones centrífugas desde los núcleos receptores de proyecciones del BO y del BOA (Martínez-Marcos, 2009; Mohedano-Moriano et al., 2007; Mohedano-Moriano et al., 2008; Mohedano-Moriano et al., 2012).

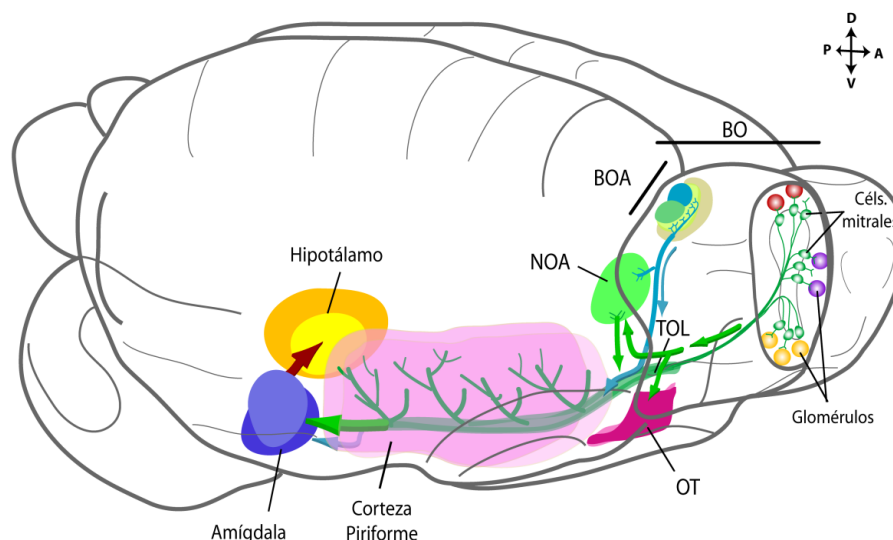


Figura 3. Esquema de la conectividad centrípeta desde el bulbo olfativo (verde) y el bulbo olfativo accesorio (azul) a sus estructuras receptoras en la corteza en el adulto. Abreviaturas: BO, bulbo olfativo; BOA, bulbo olfativo anterior; NOA, núcleo olfativo anterior; OVN, órgano vomeronasal; RMS, ruta migratoria rostral; TO, tubérculo olfativo; TOL, tracto olfativo lateral. Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

En resumen, los BOs proyectan a distintas áreas del cerebro (corteza piriforme, amígdala, corteza entorrinal e hipocampo) que llevan a cabo funciones importantes en la identificación de olores, el comportamiento de búsqueda de alimentos, las relaciones sociales, el comportamiento reproductivo, el refuerzo, las respuestas emocionales, el aprendizaje y la memoria (Arisi et al., 2012).

D. Breve descripción del desarrollo del sistema olfativo

La organización del sistema olfativo que aparece durante el desarrollo se ha explicado hasta la fecha a través de dos hipótesis contrapuestas. Por un lado, la teoría del “protomapa” predice que el EO, el BO y la CO primaria se organizan simultánea e independientemente, a través de un programa de desarrollo intrínseco de cada estructura mediante moléculas determinantes de su desarrollo (Rakic, 1988). Por otro lado, la teoría del “protocórtex” afirma que dicho desarrollo depende de elementos extrínsecos y sostiene que el desarrollo del BO es un proceso secundario dependiente de la llegada de las fibras de las NSOs desde el EO (O'Leary, 1989). Así, la consiguiente llegada de fibras del TOL a la CO sería necesaria para inducir la diferenciación en esta región cortical. Hoy en día, el mayor número de evidencias apoyan la más reconocida teoría del protomapa (López-Mascaraque y de Castro, 2002). En los trabajos citados anteriormente y como herramienta para explicar este complejo proceso, a continuación se resumen cronológicamente los principales acontecimientos del desarrollo embrionario del sistema olfativo en una escala temporal relativa para ratón (**Figura 4**; de Castro, 2009; López-Mascaraque y de Castro, 2002):

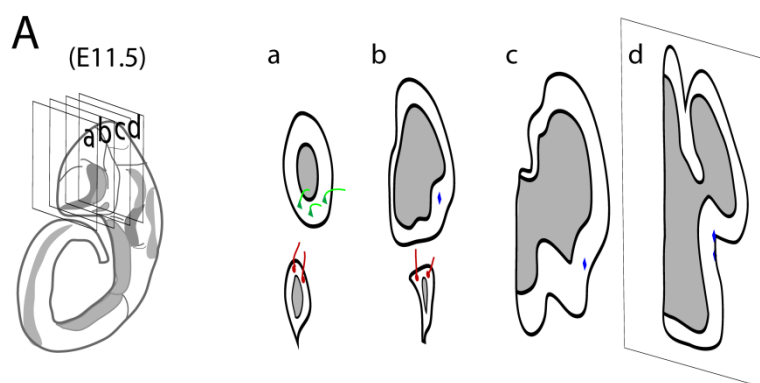


Figura 4A. La placoda olfativa comienza a formarse alrededor de E9.5, mientras que las primeras neuronas se generan en el BO a E11 y en la corteza olfativa a E10, respectivamente. Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

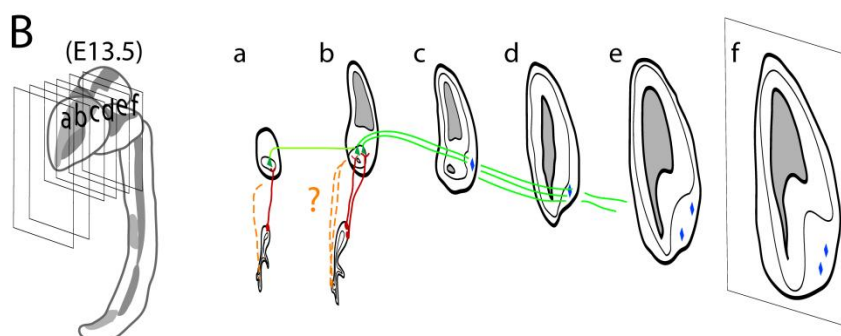


Figura 4B. Antes de E10.5 los primeros axones de las NSOs son ya identificables, pero hasta E11-E12 no se unen y forman un nervio olfativo ya patente. Alrededor de E13.5, el nervio olfativo entra al BO para formar sinapsis. Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

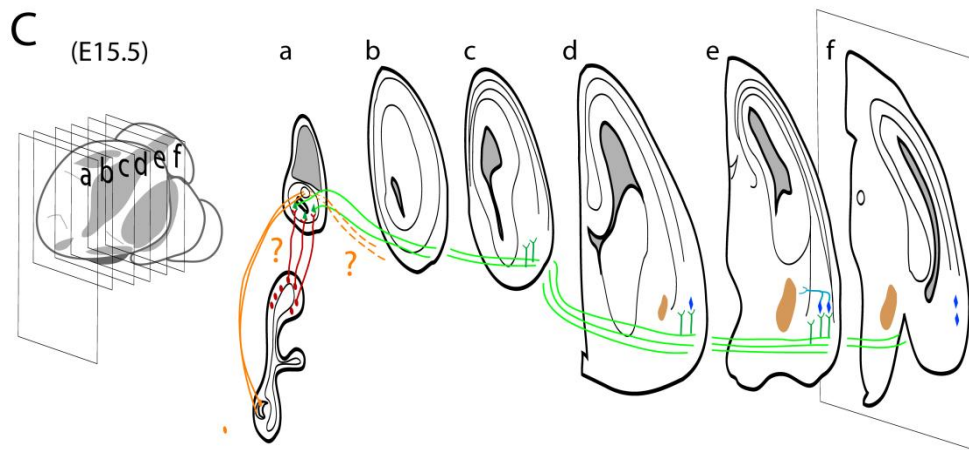


Figura 4C. El TOL se observa por vez primera como tal entre E11.5 y E12, cubre la superficie de la corteza olfativa a E13.5 y emite colaterales para colonizarla a partir de E14.5, produciéndose un pico alrededor de E15.5. Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

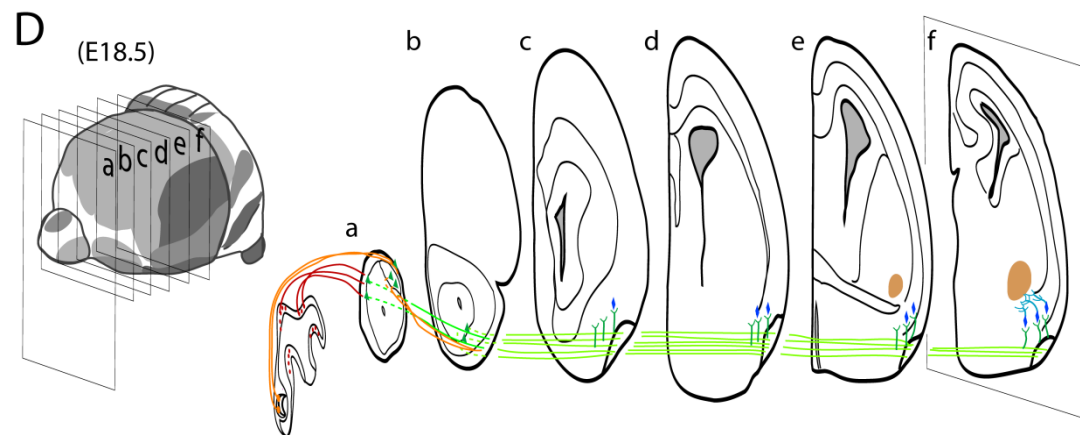


Figura 4D. Los axones de las NSOs se reorganizan topográficamente e inervan los protoglomérulos sobre E17.5 en un proceso que durará hasta la etapa postnatal (no ilustrado). La maduración de las sinapsis entre las NSOs y las neuronas del BO sucede alrededor de E17-E18, mientras que las sinapsis del BOA maduran al final de la primera semana postnatal (no ilustrado). Tomado de Suárez et al., *en prensa*.

La estructura definitiva del BO termina de moldearse con la prospectiva llegada de interneuronas generadas en la eminencia ganglionar lateral durante el desarrollo embrionario.

E. Papel de la glía radial durante el desarrollo del SNC

La generación de nuevas células neurales constituye un proceso imprescindible para el correcto desarrollo del sistema nervioso y es un elemento común en todas las especies de mamíferos. Los cuerpos celulares de la glía radial residen en la zona ventricular a lo largo del desarrollo del SNC y participan en la neurogénesis y en la migración neuronal. Al final del periodo de desarrollo, la mayoría de las células de glía radial cambian su localización y migran a otras zonas, integrándose en el parénquima tisular. En mamíferos, la mayoría de estas células se transforma en astrocitos y conserva algunas de las propiedades fundamentales propias de su papel original durante el desarrollo (Misson et al., 1991; Rakic, 1988; Schmechel y Rakic, 1979).

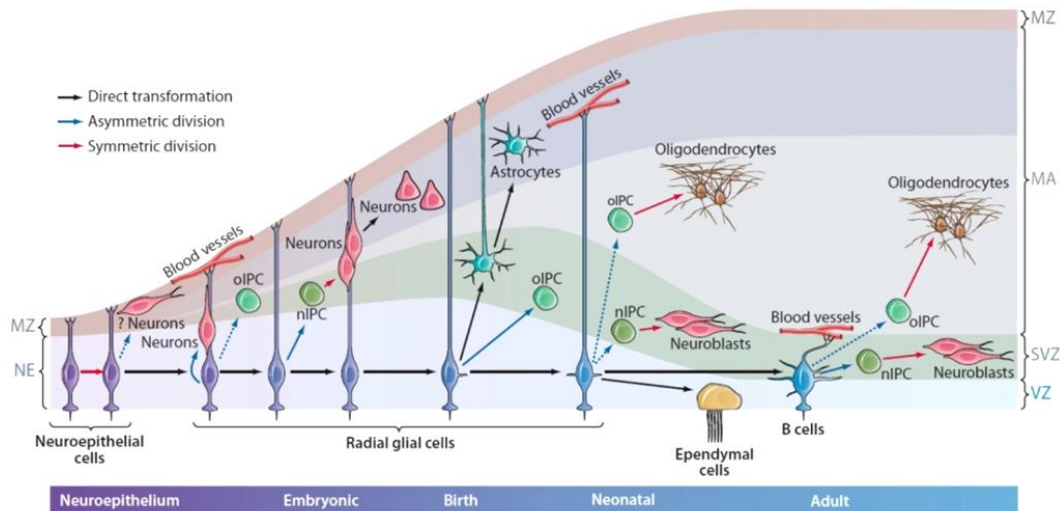


Figura. 5. Evolución de la glía radial durante el desarrollo hasta el adulto mediante tres modos de neurogénesis: transformación directa, división simétrica y división asimétrica. Durante el desarrollo postnatal, la glía radial abandona su localización apical para convertirse en astrocitos mientras que las células que permanecen en su localización, se transforman en células ependimales y células B (astrocitos de la SVZ adulta) que continúan funcionando como células progenitoras neurales. Las células B mantienen la organización epitelial de la glía radial con un proceso apical que hace contacto con el ventrículo y procesos basales que acaban en los vasos sanguíneos. Las células B siguen generando neuronas y oligodendrocitos a través de células progenitoras intermediarias neurogénicas u oligodendrogénicas. Abreviaturas: IPC, célula progenitora intermedia; MA, manto; MZ, zona marginal; NE, neuroepitelio; nIPC, célula progenitora intermedia neurogénica; oIPC célula progenitora intermedia oligodendrogénica; RG, glía radial; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Tomado de Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009.

Sin embargo, los procesos de neurogénesis y gliogénesis continúan postnatalmente y se mantienen de modo sostenido hasta la etapa adulta de manera análoga al desarrollo. Estudios con inyección de retrovirus han mostrado que la glía radial y las nuevas neuronas descienden del mismo linaje celular (Goldman et al., 1996; Spassky et al., 2005). De este modo, se ha visto en numerosas especies de vertebrados que algunas células de glía radial no se convierten en astrocitos al final del desarrollo embrionario y que persisten postnatalmente (García-Verdugo et al., 2002). Dichas células no sólo presentan características morfológicas similares a la glía radial, sino que además también desempeñan la misma función ya que actúan como progenitores primarios en la generación de neuronas y glía (**Figura 5**; para una revisión detallada: Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009).

F. La neurogénesis en el sistema olfativo adulto

Como se ha dicho anteriormente, este proceso, conocido como neurogénesis, persiste en mamíferos adultos a lo largo de la vida bajo condiciones normales, y ha sido demostrado en dos localizaciones dentro del SNC, la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular en el giro dentado del hipocampo, y en otra fuera de él, con la neurogénesis de las NSOs en el EO (**Figura 6**, Balmer y LaMantia,

2005; Graziadei y Monti Graziadei, 1985; Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011; Luskin, 1993; Zhao et al., 2008). En términos prácticos, dicha neurogénesis en el sistema olfativo representa el reemplazamiento continuo tanto de las aferencias que llegan al BO, como las interneuronas que modulan las eferencias a la CO. Esta capacidad del sistema olfativo para la reorganización de sus conexiones sinápticas y la constante renovación de sus elementos le confiere un atractivo casi único.

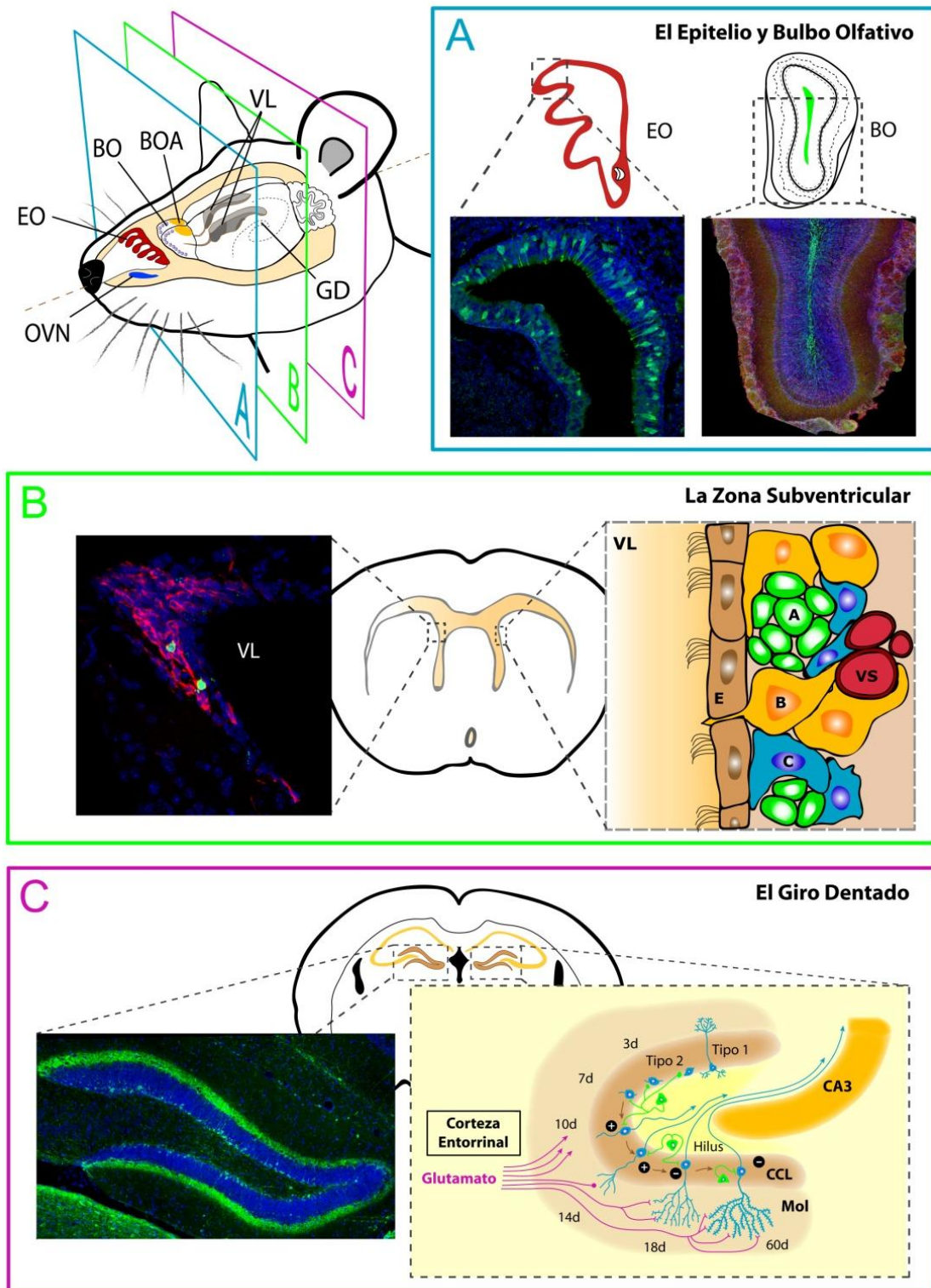


Figura 6. Esquema general de los principales nichos neurogénicos en el SNC adulto. En el primer panel se muestra una representación de una cabeza de. **(A)** Corte transversal en que se representa el primer nicho neurogénico, el EO con NSOs OMP⁺ (verde) que conectan con los glomérulos del BO, representado a la derecha. **(B)** Corte transversal que contiene la SVZ, el segundo nicho neurogénico, donde se generan neuronas y oligodendrocitos en el adulto. En el panel de la izquierda se muestra una imagen con neuroblastos DCX⁺ (rojo) y PH3⁺ (verde). En el panel de la derecha se ilustra el nicho neurogénico con las distintas células que lo componen: las células progenitoras neurales adultas (tipo B), que dan lugar a las células amplificadoras proliferación rápida (tipo C), las cuales expanden la población y dan lugar a neuroblastos (tipo A) u oligodendrocitos. **(C)** Corte transversal del cerebro con el hipocampo. En el panel de la izquierda se muestra una imagen de células CR⁺ (verde), mientras que en el panel de la derecha se ilustra un esquema de la organización de la estructura, su conectividad y maduración.

De este modo, el BO de roedores adultos se encuentra recibiendo nuevas neuronas constantemente que reemplazan a las ya existentes (Álvarez-Buylla y Lim, 2004; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Estas células nuevas alcanzan su destino después de haber realizado un largo proceso migratorio a través de la ruta migratoria rostral (RMS) desde su lugar de origen: la zona subventricular (SVZ), un extenso nicho germinal adyacente a las paredes de los ventrículos laterales. En la SVZ, los progenitores primarios (células B1) dan lugar a las células amplificadoras de división rápida (células C), las cuales expanden la población y a su vez se diferencian en jóvenes neuronas (neuroblastos o células A) y en oligodendrocitos (**Figuras 6B y 7**; Aguirre y Gallo, 2004; Doetsch et al., 1999; Doetsch et al., 2002; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Menn et al., 2006). Además, por el gran número de neuronas producidas y por la enorme distancia que deben recorrer los neuroblastos desde el origen hasta su destino, la neurogénesis de interneuronas del BO constituye un modelo muy interesante tanto en el desarrollo como en la etapa adulta.

Sin embargo, se ha visto que también la RMS y partes de la pared en contacto con los ventrículos, como el septo (pared medial) o el cuerpo calloso o palio (pared dorsal), contienen células proliferativas que actúan como progenitoras *in vitro* (Doetsch et al., 1999; Gritti et al., 2002) e *in vivo* (Merkle et al., 2007), con lo que estas zonas podrían ser consideradas un único nicho neurogénico con células progenitoras neurales con un alto grado de heterogeneidad que se organizan en distintas subpoblaciones progenitoras (Beech et al., 2004; Hack et al., 2005; Kelsch et al., 2007; Kohwi et al., 2005; Merkle et al., 2007; Waclaw et al., 2006; Young et al., 2007). En consecuencia, se ha demostrado que también existe un cierto grado de heterogeneidad molecular en los neuroblastos migrantes antes de alcanzar el BO (Baker et al., 2001; De Marchis et al., 2004; Jankovski y Sotelo, 1996).

G. Factores reguladores de la neurogénesis en al SVZ del adulto

Una larga lista de elementos que intervienen en la neurogénesis ha sido ya descrita hasta la fecha como reguladores de la morfología, homeostasis, auto-renovación o diferenciación de las células progenitoras, pudiendo clasificarse en factores intrínsecos y extrínsecos. Los primeros son producidos por las propias células progenitoras de la

SVZ y pueden ser dependientes o independientes del fenotipo celular (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005; Waclaw et al., 2006). Los segundos provienen del tejido de alrededor, como la matriz extracelular u otras células, y llegan por diversos mecanismos, tales como por difusión o a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) o de la vasculatura: neurotransmisores, hormonas o factores de crecimiento, que junto con factores ambientales como las lesiones, regulan procesos celulares claves como proliferación, migración, maduración y supervivencia (Bordey, 2006; Hack et al., 2005; Hagg, 2005; Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011).

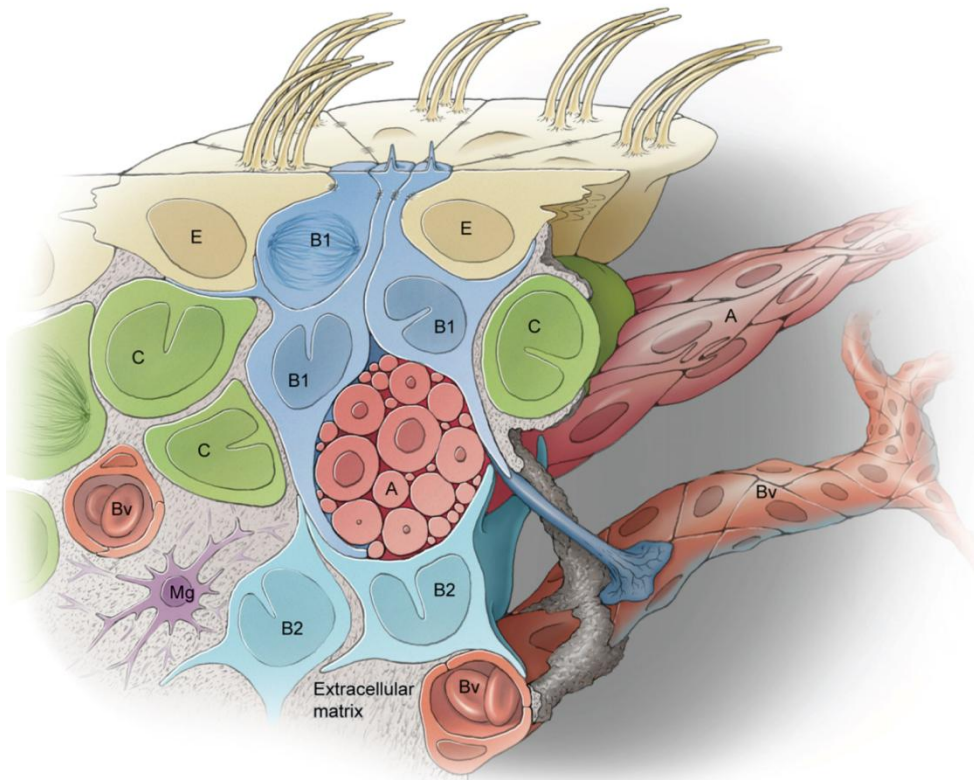


Figura 7. Esquema detallado del nicho neurogénico de la SVZ. Tomado de Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011.

En concreto, se ha descrito que rutas de señalización externas, incluidas las de receptores tirosín-quinasa y varios morfógenos, se encuentran implicadas en el control de la neurogénesis en la SVZ de adultos. Para tener una idea de ello, las células madre se aíslan *in vitro* a partir de las paredes de los ventrículos laterales y, para conseguir que se conviertan en neuroesferas, se estimula su crecimiento con el EGF, el FGF2 o una combinación de ambos (Reynolds et al., 1992; Scheffler et al., 2005; Vescovi et al., 1993). Otros trabajos han descrito que PDGF incrementa la generación *in vitro* de neuroesferas en cooperación FGF2 (Jackson et al., 2006).

a. El epéndima, el líquido cefalorraquídeo y el cilio primario

Un creciente número de trabajos sugiere que las señales que llegan a las células neurales progenitoras de la SVZ a través de las células endoteliales ciliadas y el LCR podrían influir en su comportamiento. Las paredes de los ventrículos muestran una organización planar específica: los pequeños procesos apicales de una o más células de progenitoras primarias (o de tipo B1) se encuentran rodeados por una roseta de células endoteliales, formando en su superficie estructuras semejantes a un molinillo (Mirzadeh et al., 2008). Esta organización es única para la región del ventrículo donde tiene lugar la neurogénesis adulta. Curiosamente, las células B1 establecen uniones adherentes simétricas con otras células B1 adyacentes y asimétricas con las células endoteliales que las rodean, quedando abierta la posibilidad de que modulen su estado celular a través de estos contactos adhesivos. Un examen exhaustivo de la superficie del ventrículo revela la presencia de zonas calientes (*hotspots*) de células B1 donde se observa una mayor densidad de este tipo celular (**Figura 8**; Mirzadeh et al., 2008).

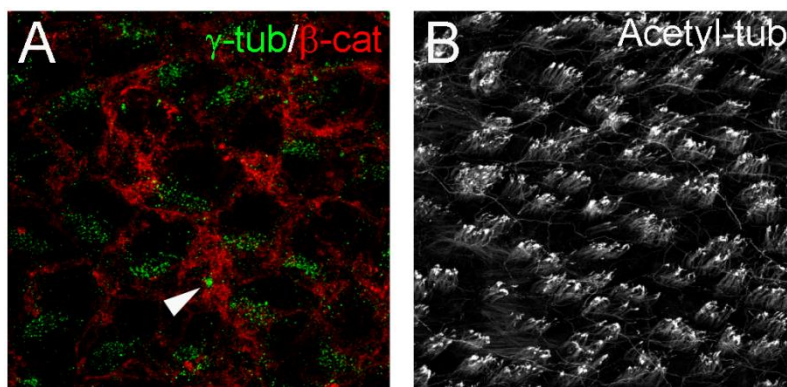


Figura 8. (A) Las células endoteliales se encuentran en contacto directo con el ventrículo y presentan numerosos cilios cuyos cuerpos basales (γ -tubulina⁺) se insertan en la membrana de las células (β -catenina⁺). Su distribución en la membrana sigue un patrón establecido por la región en que se asemeja a un molinillo: alrededor del cilio primario de una célula B (flecha) se organizan las endoteliales a modo de roseta. Los cilios presentan una distribución polarizada en la superficie celular. **(B)** El cuerpo entero del cilio es inmunorreactivo para la proteína tubulina acetilada y nos da información de su estructura y organización general.

El papel exacto de los componentes del LCR en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células B1 no se conoce a día de hoy. El único punto de contacto de estas células con el LCR es el cilio primario y plantea diversas posibilidades acerca de la regulación de la actividad de las células progenitoras primarias. El cilio primario se cree que tiene un papel mecanosensor que detectaría cambios en el flujo del LCR (Singla y Reiter, 2006), y también funciona a modo de antena que capta diversas señales que activan las rutas de señalización, como las de Hedgehog, Wnt y PDGF (Corbit et al., 2005; Eggenschwiler y Anderson, 2007; Jackson et al., 2006; Rohatgi et al., 2007). Esto se ha demostrado esencial para la formación de células progenitoras

neurales en el hipocampo (Han et al., 2008). Sin embargo, la fuente precisa de estos tres factores no ha sido determinada y queda la duda de si estas proteínas han sido generadas localmente y liberadas al LCR a partir de otras células en contacto con el ventrículo, o a través de otro mecanismo.

En cambio, las células endodimales presentan numerosos cilios, con cuyo batimiento contribuyen al establecimiento del flujo del LCR, el cual a su vez, determina la dirección de la migración de las neuronas jóvenes (Sawamoto et al., 2006). Además, las células endodimales son necesarias para la generación de gradientes de las moléculas quimiorrepelentes, como Slit-2, producidas por los plexos coroideos y que dirigen la salida de neuroblastos anterior desde la SVZ al BO (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004; Sawamoto et al., 2006). Es importante recalcar que las células endodimarias, al igual que sus progenitoras las células de glía radial, también exhiben una polarización que corresponde con la dirección del flujo del LCR (Mirzadeh et al., 2010b). Así, la organización de la polaridad planar de las células durante el desarrollo estaría determinada por el cilio primario de la glía radial, los cilios motores de las células endodimales inmaduras y el flujo del LCR (Guirao y Joanny, 2007; Mirzadeh et al., 2010b).

b. La vasculatura y la ECM

Junto con el papel emergente de los contactos apicales con el LCR, la parte basal de la SVZ también presenta un aspecto muy interesante que merece la pena destacar debido a su gran potencial como fuente de señales reguladoras del comportamiento de las células progenitoras neurales. El nicho neurogénico adyacente a los ventrículos contiene una extensa lámina basal con un amplio abanico de componentes de la ECM, como por ejemplo, tenascina-C, laminina y HSPG, que está en contacto con todos los tipos celulares (Gates et al., 1995; Mercier et al., 2002; Shen et al., 2008). La densa red vascular que se encuentra bajo la capa de la SVZ supone otra fuente de interacciones entre células endoteliales, factores provenientes del torrente sanguíneo y progenitores neurales. Además, las células B1, además de sus contactos apicales con el LCR, extienden largos procesos basales que terminan en pies que establecen contactos directos con los vasos sanguíneos (**Figura 9**; Mirzadeh et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Estudios usando moléculas trazadoras inyectadas han indicado que la vasculatura en esta región tiene una mayor permisividad que la barrera hematoencefálica en otras regiones, y que posiblemente permita la llegada de señales del flujo sanguíneo difundir en esta región y alcanzar el nicho (Tavazoie et al., 2008). Junto con esto, las propias células endoteliales podrían secretar factores que contribuyan a la autorrenovación o proliferación de las células progenitoras neurales, puesto que en co-cultivos con células endoteliales se ha visto un incremento en la generación de neuroesferas *in vitro* a partir de progenitores embrionarios (Shen et al., 2004).

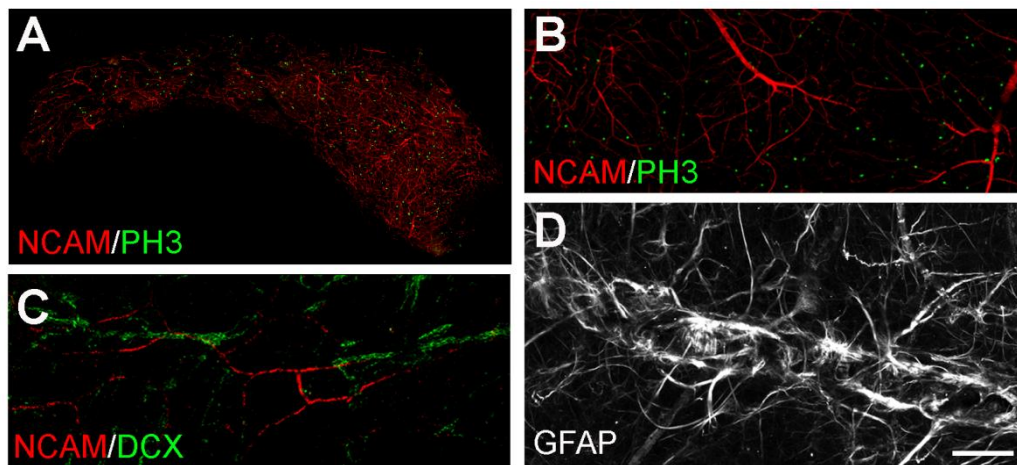


Figura 9. La vasculatura representa un papel crucial en el mantenimiento del nicho neurogénico de la SVZ y en la migración de neuroblastos. **(A)** *Whole-mount* de la SVZ inmunomarcado con NCAM (vasos sanguíneos) y células en proliferación (PH3⁺). **(B)** Detalle a mayor aumento de otro *whole-mount*. **(C)** Los vasos sanguíneos también sirven de soporte mecánico para los neuroblastos en migración (DCX⁺), que se desplazan en paralelo a los vasos. **(D)** Los astrocitos en la SVZ extienden procesos basales que alcanzan los vasos sanguíneos y recibir distintas señales. Barra de escala: 500 μm en **(A)**; 200 μm en **(B)** y **(C)**; 20 μm en **(D)**.

H. La RMS y la migración

Como ya se ha dicho anteriormente, los neuroblastos generados en la SVZ migran hasta el BO formando cadenas o rosarios de células, donde se diferencian en interneuronas locales (**Figura 10**; Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Se ha estimado alrededor de 30.000 el número de células que llega a diario al BO (Lois y Álvarez-Buylla, 1994). Dicha migración de neuroblastos a lo largo de la extensión rostral de la SVZ, producida por el cierre del ventrículo del BO hasta la SVZ durante el desarrollo, tiene lugar dentro de unas estructuras de forma tubular dormada por astrocitos inmunorreactivos para GFAP. Es durante el periodo postnatal del desarrollo cuando se produce la maduración de los canales astrocitarios que rodean los neuroblastos en migración y que se completa, aproximadamente, 15 días después el parto (Peretto et al., 2005). Estas células gliales, localizadas a lo largo de la RMS hasta el BO, también poseen un potencial neurogénico intrínseco, y de ellas se han conseguido aislar células precursoras que han dado lugar a células de estirpe neuronal, astrogliar y oligodendroglial (Aguirre y Gallo, 2004; Alonso et al., 2008; Gritti et al., 2002). Dicha migración recibe el apelativo de tangencial y transcurre a gran velocidad, entre 30 y 100 μm/h según distintos autores (Pignatelli et al., 2009; Wichterle et al., 1997) y recorre distancias que varían entre 5 mm en roedores hasta a 20 mm en monos para alcanzar su destino (Doetsch y Álvarez-Buylla, 1996; Kornack y Rakic, 2001; Lois y Álvarez-Buylla, 1994), para lo que requieren un tiempo total de entre 4 y 10 días en roedores (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Aunque en condiciones normales los neuroblastos se dirigen únicamente hacia el BO, se han observado postnatalmente migraciones dorsales desde la SVZ ligadas a vasos sanguíneos dirigidas a la corteza prefrontal, entre otras localizaciones (Inta et al., 2008;

Le Magueresse et al., 2012). Igualmente, tras lesiones en la corteza cerebral, en el estriado o en el cuerpo calloso, se ha visto que dichas células pueden dirigirse a las zonas dañadas (Goings et al., 2004; Sundholm-Peters et al., 2005). Estudios de seguimiento espacio-temporal de células individuales por microscopía en rodajas de cerebro han mostrado que en la migración a lo largo de la RMS tiene un lugar un proceso llamado secuencia de translocación nuclear junto con la elongación de un proceso de guía por parte de la célula (De Marchis et al., 2001; Kakita y Goldman, 1999; Suzuki y Goldman, 2003; Carleton et al., 2003; Luskin, 1993; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Sin embargo, este proceso es más complicado de lo que se creyó en un principio y hoy se sabe que está controlado por una conjunción de multitud de factores.

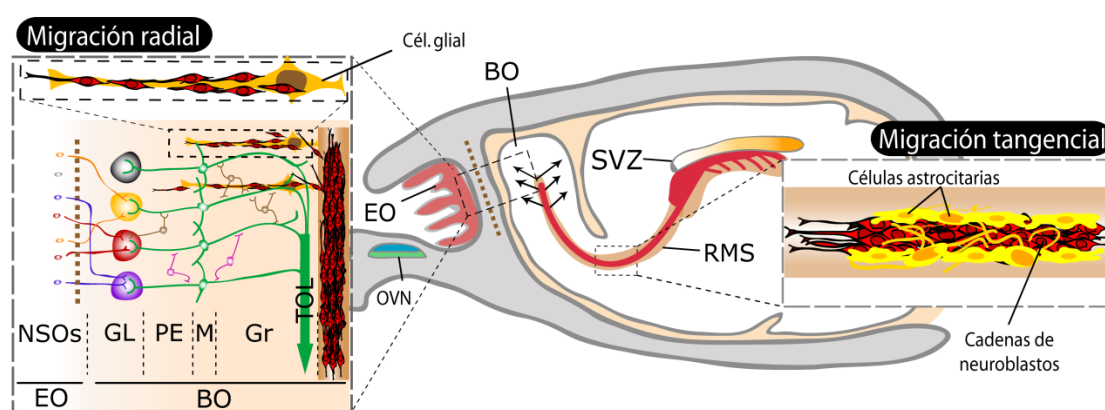


Figura 10. Esquema de la migración desde la SVZ al BO. Los neuroblastos generados en la SVZ migran rápidamente de modo tangencial formando cadenas de células a través de canales de astrocitos que componen la RMS hasta su llegada al BO. Una vez allí, los neuroblastos modifican su patrón migrador y pasan a migrar radialmente, de un modo más lento y asociados a células gliales y vasos sanguíneos hasta integrarse en su capa específica de destino. Abreviaturas: BO, bulbo olfativo; EO, epitelio olfativo; GL, capa glomerular; Gr, capa granular; M, capa mitral; NSO, neurona sensitiva olfativa; OVN, órgano vomeronasal; PE, capa plexiforme externa; RMS, ruta migradora rostral; SVZ, zona subventricular; TOL, tracto olfativo lateral. Adaptado de: Lledó et al., 2008.

I. Estructura general del BO y diferenciación de las interneuronas

a. Células granulares (CG)

Aalrededor del 75% de las células derivadas de la SVZ se diferencian en interneuronas GABAérgicas que se integran en la capa de las células granulares (CG) del BO (Carleton et al., 2003; Luskin, 1993; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Antes de convertirse en células granulares plenamente maduras, los neuroblastos pasan por una serie de estadios que han sido caracterizados electrofisiológica y morfológicamente (Carleton et al., 2003).

Las CG se subdividen en distintas poblaciones atendiendo a criterios morfológicos y de expresión de marcadores. Las CG superficiales, cuyas dendritas alcanzan

principalmente la lámina superficial de la CPE, establecen sinapsis con las neuronas empenachadas (Shipley y Adamek, 1984), mientras que las CG profundas contactan sobre todo con las dendritas de las neuronas mitrales en la lámina profunda de la capa plexiforme externa (CPE; (Kelsch et al., 2007; Shipley y Adamek, 1984). Puesto que las células mitrales y las empenachadas proyectan a distintas regiones de la CO, estas dos poblaciones de células podrían formar parte de circuitos neuronales separados para la olfacción. Por un lado, el circuito de CG-empenachadas parece mediar la percepción de odorantes a bajo umbral (Liu y Shipley, 1994; Nagayama et al., 2004), mientras que las interacciones entre CG y mitrales parecen ser importantes para la discriminación de olores (Lledo y Lagier, 2006).

Un proceso interesante que tiene lugar es el mecanismo de regulación del modo en que las dendritas de las CG se dirigen hacia sus destinos y establecen las conexiones con tipos celulares específicos. En principio, este hecho podría ser determinado tanto por el microambiente local del circuito neuronal en la zona de destino o bien ser dictado por algún mecanismo intrínseco de las neuronas inmaduras, inherente a su linaje concreto. Estudios recientes han descrito la existencia de dos subtipos de CGs con distintos patrones de árbol dendrítico que inervan de forma concreta la capa plexiforme externa superficial o profunda, respectivamente (Kelsch et al., 2007). Además, mediante transplantes heterocrónicos y heterotópicos se ha visto que dicho patrón de arborización dendrítica en CGs postnatales y adultas es una propiedad autónoma de la célula, predeterminada desde el momento de su nacimiento (Kelsch et al., 2007).

b. Células periglomerulares (CPG)

Es sabida la existencia de al menos tres subtipos de interneuronas GABAérgicas en la capa glomerular del BO. Estas tres poblaciones, que apenas se solapan entre sí, se distinguen por su expresión de dos miembros de la familia de proteínas ligadoras de calcio de calretinina (CR^+), calbindina (CB^+) o tirosina hidroxilasa (TH^+ ; subpoblación dopaminérgica) y todas son generadas o regeneradas de modo continuo en el adulto (**Figuras 11 y 12**; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007; Parrish-Aungst et al., 2007). En el ratón, las CG y las tres subpoblaciones de CPG expresan GABA (Kohwi et al., 2007; Kosaka y Kosaka, 2005), mientras que en la rata sólo las CG y las CPG TH^+ son GABAérgicas (Kosaka y Kosaka, 2005). Sin embargo, todavía no está claro si las poblaciones celulares definidas por estos marcadores corresponden directamente con aquellas definidas por criterios morfológicos o electrofisiológicos (McQuiston y Katz, 2001; Philpot et al., 1997). En realidad, sólo una pequeña proporción de CPGs dopaminérgicas es generada en el desarrollo embrionario y neonato, ocurriendo la mayor parte de su producción en el desarrollo postnatal y adulto (McLean y Shipley, 1988; Winner et al., 2002), constituyendo una fracción significativa de las interneuronas generadas en el adulto que alcanzan la capa glomerular (Baker et al.,

2001; Cave y Baker, 2009; Winner et al., 2002). El establecimiento de contactos sinápticos directos con los axones del nervio olfativo (OMP⁺) parece ser el proceso clave para que estas células completen su diferenciación y alcancen su destino final (**Figura 11**; Pignatelli et al., 2009).

En la CPE y en la capa de las células mitrales también pueden hallarse algunas interneuronas TH⁺ (Baker et al., 2001; Saino-Saito et al., 2004). Se cree que las TH⁺ fuera de la capa glomerular desempeñan diversas propiedades funcionales y despliegan un gradiente de madurez hacia el fenotipo dopaminérgico maduro hacia las zonas más superficiales del BO. Otra población pequeña de interneuronas GABAérgicas (PV⁺), también se encuentra en la CPE y presenta una tasa de renovación más reducida en el adulto en comparación con las demás poblaciones.

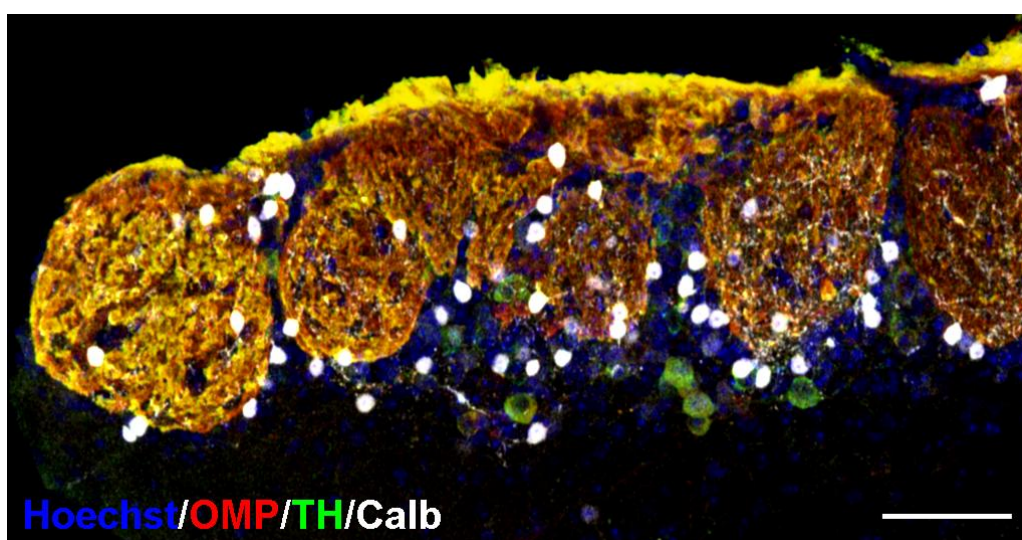


Figura 11. Ejemplo de marcaje en la capa glomerular de BO con OMP, TH y calbindina. Los axones provenientes del EO expresan OMP y establecen contacto directo con las dendritas de las neuronas periglomerulares TH⁺. En esta capa las neuronas calbindina⁺ constituyen una subpoblación celular apenas solapante con la subpoblación dopaminérgica. Barra de escala: 50 µm.

c. Origen de las interneuronas del BO

La producción de interneuronas del BO comienza durante el desarrollo embrionario en el día E14 (Wichterle et al., 2001). Como ya se ha dicho anteriormente, los precursores del neuroepitelio en la mayoría de zonas del telencéfalo embrionario presentan una morfología radial similar y expresan marcadores antigénicos característicos de la glía radial (Malatesta et al., 2003; Noctor et al., 2002). Sin embargo, también hay diferencias regionales en la expresión génica, incluidos factores de transcripción localizados zonalmente (Kriegstein y Gotz, 2003). Por ejemplo, la eminencia ganglionar medial (EGM) expresa Nkx2.1, la EGM y la eminencia ganglionar lateral (EGL) expresan Gsh2, la zona corticoestriatal expresa Dbx1 y la corteza en desarrollo expresa Emx1 (Kriegstein y Gotz, 2003). Según avanza el desarrollo, el nicho germinal neuroepitelial (zona ventricular) se reduce y sólo una proporción relativamente pequeña de células

progenitoras neurales persisten en la SVZ de adultos. Con todo ello, el grueso de datos disponibles en la actualidad apunta a que las células progenitoras neurales de adulto son descendientes directas de la glía radial de la EGL (ver apartado anterior sobre glía radial). Por ejemplo, diversos estudios con transplantes han demostrado que la SVZ adulta proviene de la EGL ya que los progenitores de la EGL transplantados en otra EGL o en la SVZ adulta producen neuroblastos que migran al BO y que se diferencian en interneuronas maduras similares a las generadas en el adulto (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Wichterle et al., 1997). Otro tipo de experimentos basados en la manipulación genética también han relacionado la EGL con la SVZ adulta, viendo que, el neuroepitelio telencefálico da lugar a distintas regiones en el adulto donde las células progenitoras expresan determinados factores de transcripción. En concreto, se ha visto que la SVZ adulta expresa *Dlx1/2*, *ER81* (Stenman et al., 2003), *Mash1* (Parras et al., 2004), *Pax6* (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005) y *Sp8* (Waclaw et al., 2006), un grupo de factores de transcripción que también se encuentra expresado en la EGL dorsal durante el desarrollo embrionario (**Figura 12A**).

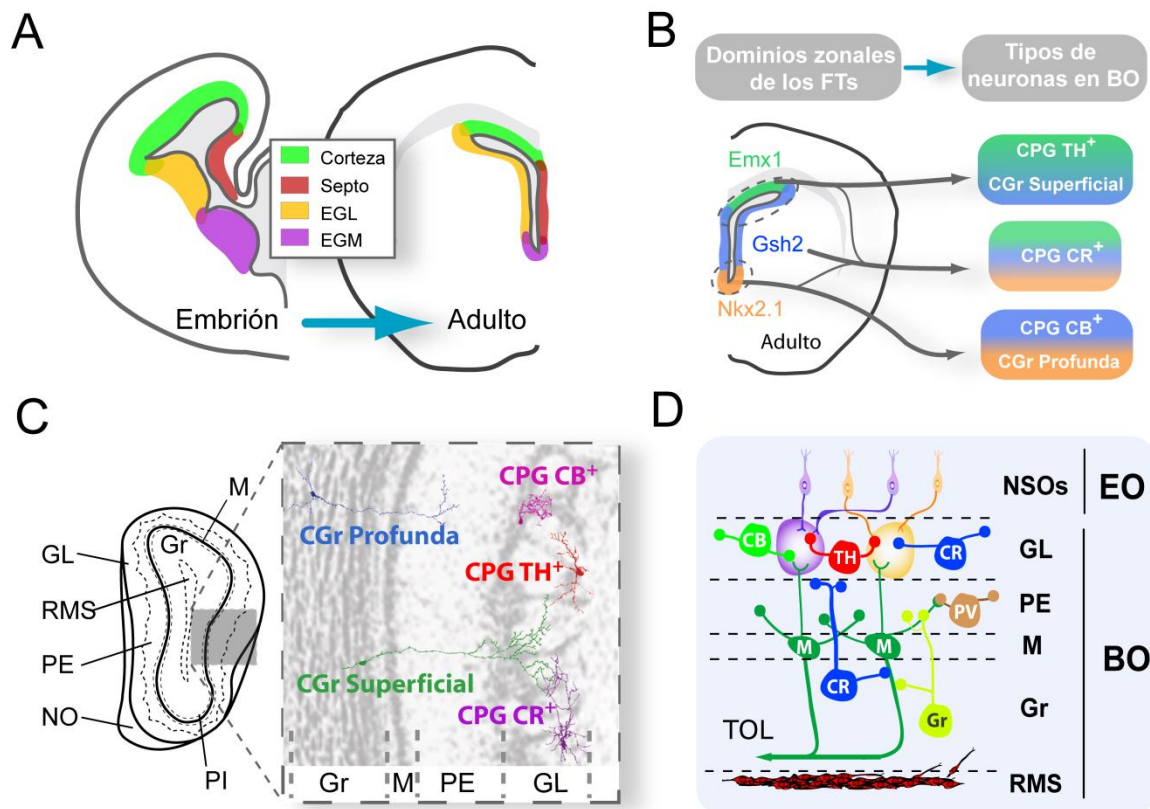


Figura 12. Especificación zonal de las células progenitoras neurales en el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto. En (A) se muestran secciones transversales de cerebros de embrión y de ratón adulto con cuatro subdivisiones de la VZ (corteza, septo, EGL y EGM) en distintos colores. (B) La expresión diferencial y/o combinada de varios factores de transcripción definen los diferentes subdominios y los tipos de neuronas producidos en el adulto (ver el texto para más detalles). (C) Los subtipos de interneuronas de BO generados en la SVZ se integran en el BO de modo específico siguiendo un patrón establecido. (D) Esquema simplificado de las conexiones intrabulbares con la presencia de las neuronas producidas en la SVZ en cada capa correspondiente (ver texto para más detalles. Abreviaturas: BO, bulbo olfativo; CB, calbindina; CGr, célula granular; CPG, célula periglomerular; CR, calretinina; EGL,

eminencia ganglionar lateral; EGM, eminencia ganglionar media; EO, epitelio olfativo; FT, factores de transcripción; GL, capa glomerular; Gr, capa granular; M, capa mitral; NO, capa del nervio olfativo; NSO, neurona sensitiva olfativa; PE, capa plexiforme externa; PI, capa plexiforme interna; PV, parvalbúmina; RMS, ruta migratoria rostral; SVZ, zona subventricular; TH, tirosina hidroxilasa; TOL, tracto lateral olfativo; VZ, zona ventricular. Adaptado de: Lledó et al., 2008; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011.

Otros experimentos de mapeo de destino genético identificaron los dominios transcripcionales en interneuronas de BO derivadas de éstos (Kohwi et al., 2007; Young et al., 2007). Así se vio que la corteza del neuroepitelio y la SVZ dorsal (dominio *Emx1+*) generan principalmente CG superficiales, CPG-TH+ y algunas CPG-CR+, mientras que la SVZ ventral (dominio *Nkx2.1+*) produce sobre todo CG profundas y CPG-CB+. En cambio, las interneuronas derivadas de los dominios *Gsh2* o *Dlx5/6* generan todo tipo de CPG. En resumen, el nicho neurogénico de la SVZ queda subdividido en distintas regiones funcionales discretas derivado del neuroepitelio embrionario (EGM, EGL y corteza; **Figura 12B-C**; Kohwi et al., 2007; Merkle et al., 2007; Young et al., 2007).

II. EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO 2 (FGF2) Y SUS RECEPTORES

Los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) fueron una de las primeras familias de factores de crecimiento en ser identificadas y se ha visto que activan procesos de señalización cruciales para el desarrollo en todos los metazoos. Este hecho es especialmente evidente en el sistema nervioso, donde los diferentes FGFs desempeñan numerosas funciones, sobre todo relacionadas con procesos del desarrollo, entre otros, la inducción neural, la angiogénesis, la supervivencia y la diferenciación celular, incluyendo fenómenos específicos como la orientación del crecimiento axonal y la formación de sinapsis. Cabe señalar que los FGFs siguen expresándose y desarrollando funciones relevantes en el SNC adulto, donde se ha visto que está relacionado con desórdenes de ansiedad.

Uno de los ligandos prototípicos de esta familia es FGF2 (antiguamente conocido como FGFB o FGF básico) fue purificado por primera vez a partir hace más de 30 años y de los primeros en ser clonado en los años 1980, por lo que también es uno de los más estudiados y conocidos. A partir de entonces, nuevos miembros de la familia han sido identificados y la secuenciación de los genomas humano y de ratón ha revelado la existencia de un total de 22 FGFs en cada especie, 10 de los cuales se expresan en el SNC durante su desarrollo (**Figura 13A**; Ford-Perriss et al., 2001).

En los vertebrados, los FGFs tienen un peso molecular que varía entre 17-34 kDa. La estructura de todos los FGFs es bastante similar: tienen un núcleo interno con 28 aminoácidos altamente conservados, de los cuales 10 son los responsables de su interacción con el receptor (Ornitz, 2000; Reuss y von Bohlen und, 2003). Algunos pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, tales como *splicing* alternativo glicosilaciones, que pueden alterar su afinidad por el receptor (Baird y Klagsbrun,

1991). Concretamente, FGF2 carece de péptido señal, puede ser secretado por vías no canónicas y también puede ser translocado mediante rutas secretoras y pasar a la membrana nuclear (Ornitz y Itoh, 2001).

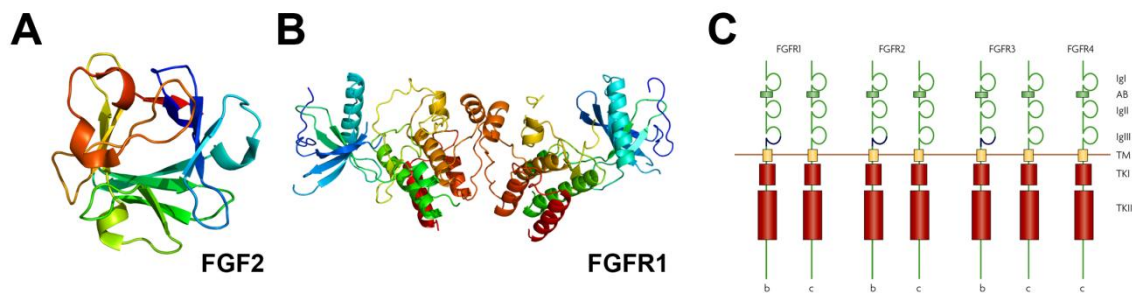


Figura 13. Estructura de FGF2, FGFR1 y los distintos FGFRs. (A) Estructura tridimensional de FGF2. (B) Estructura tridimensional de FGFR1. (C) Esquema comparativo de los distintos FGFRs y de las isoformas resultantes del *splicing* alternativo. Tomado de *Protein Data Bank Europe* y de Mason, 2007.

Los FGFs llevan a cabo su función a través de una familia de receptores específicos, los FGFRs, formada por cinco miembros diferentes (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4* y *FGFR5*), que a su vez pertenecen a la superfamilia de los receptores tirosín-quinasa (**Figura 13B-C**). Los FGFRs están formados por una región extracelular con tres dominios de inmunoglobulina (IgI, IgII, y IgIII), un dominio ácido entre IgI y IgII, una hélice transmembrana y un dominio citoplasmático tirosín-quinasa (Ornitz, 2000). El dominio ácido entre IgI y IgII contiene aminoácidos con carga negativa (*acid box*), donde se unen los HS. Existen varias isoformas de FGFRs debido al *splicing* alternativo de los genes para FGFR-1, -2, y -3, cada una con distinta especificidad para los diferentes FGFs (Ornitz et al., 1996; Reuss y von Bohlen und, 2003). La región de la proteína que más afecta a la unión de los FGFs al receptor correspondiente es una porción del dominio IgIII para el que existen tres isoformas diferentes: IgIIIa, IgIIIb y IgIIIc. Mientras que para FGFR1 y FGFR2 se han descrito las tres formas (Chellaiah et al., 1994; Ornitz, 2000), para FGFR3 sólo existen IgIIIb y IgIIIc (Vainikka et al., 1992). En concreto, FGF2 puede unirse, al menos, de cada FGFR a un miembro de los dos ó tres que hay como resultado del *splicing* alternativo (Mason, 2007).

Para la correcta unión y estabilización del complejo FGF/FGFR, es necesaria su interacción con (HS). Los HS se localizan en las membranas celulares o en la ECM y se unen a los FGFs tras ser secretados desde las células y actuarían, por tanto, como FGFRs de baja afinidad. De hecho, se ha postulado que la actividad y especificidad de los FGFs pudiera estar modulada por los HS y las enzimas que los sintetizan o degradan (Ornitz, 2000). La formación del complejo de señalización FGF/FGFR/HS es un proceso bien estudiado. En primer lugar se combinan FGF/FGFR y se estabiliza este complejo con la ayuda de HS, resultando en un ratio global de 2:2:1 (Mohammadi et al., 2005). Esta combinación inicial permite la dimerización del receptor, que a su vez, posibilita la unión de una segunda molécula de FGF, con lo que se consigue el complejo final

estable (Ornitz, 2000).

La actividad de FGF ha sido descrita en el mantenimiento de nichos de células progenitoras in vivo, incluyendo la médula espinal (Akai et al., 2005; Delfino-Machín et al., 2005), la placoda olfativa (Kawauchi et al., 2005) y el telencéfalo durante el desarrollo (Ohkubo et al., 2004; Vaccarino et al., 1999; Zheng et al., 2004). Un papel fundamental para FGF2 en estas poblaciones es la aceleración del ciclo celular a través de un acortamiento de la fase G1 (Ohkubo et al., 2004; Zheng et al., 2004). Así mismo, la activación de FGFR1 promueve la autorrenovación por divisiones simétricas, mientras que su inactivación resulta en divisiones asimétricas y neurogénesis (Maric et al., 2007).

III. LA MATRIZ EXTRACELULAR Y ANOSMINA-1

A. La matriz extracelular

Las proteínas de ECM incluyen múltiples dominios plegados independientemente cuyas secuencias y organización se encuentran altamente conservadas. Algunos de estos dominios se unen a receptores de adhesión, como por ejemplo las integrinas, que median en la adhesión de la célula a la matriz y que también son trasductoras de señales al interior celular. Sin embargo, las proteínas de ECM también se unen a factores de crecimiento y regulan su distribución, activación y presentación a las células. Actuando de un modo organizado, como ligandos de fase sólida, las proteínas de ECM pueden integrar señales complejas y plurivalentes en las células de un modo regulado y siguiendo un determinado patrón espacial.

La ECM juega papeles biológicos que van mucho más allá de aportar un soporte estructural. Las moléculas de la ECM son sintetizadas y secretadas al espacio extracelular, donde se asocian con receptores de superficie y regulan diversas funciones celulares. La importancia de la ECM para plasticidad sináptica inducida por la experiencia previa y la regulación y mantenimiento del equilibrio homeostático sináptico son funciones que se conocen desde hace una década (Dityatev et al., 2010; Herz y Chen, 2006; Kramar et al., 2003). Datos recientes apoyan la idea de que alteraciones en la ECM podrían contribuir a un desequilibrio en la función sináptica en ciertas patologías de origen genético, en enfermedades neurodegenerativas, tales como la epilepsia, el Alzheimer y la esquizofrenia, y en formación de tumores (Bonneh-Barkay y Wiley, 2009; Dityatev y Fellin, 2008; Herz y Chen, 2006; Kramar et al., 2003; Lu et al., 2012; Pantazopoulos et al., 2010). Además, el papel de la ECM en el desarrollo del SNC es muy relevante, interviniendo en fenómenos como el mantenimiento de los nichos neurogénicos, la migración y la diferenciación celular durante el desarrollo y en el adulto (Pujadas et al., 2010; Raymond et al., 2009; Shen et al., 2008).

Todas las células se encuentran en contacto directo con la ECM, ya sea de modo

continuo o durante importantes fases de su vida (por ejemplo, como células progenitoras o durante distintos procesos como su migración). La ECM es sobre todo conocida por dar un soporte estructural a los órganos y tejidos, así como a las capas de células situadas en la base de las membranas y en el caso de las células individuales, como sustrato para su migración. El papel de la ECM en la adhesión celular y en la señalización a otras células a través de receptores, tales como las integrinas, es bien sabido y, más recientemente, las características mecánicas de la matriz (deformabilidad, dureza, grado de difusión) también han sido reconocidos por influir en el comportamiento celular (Berrier y Yamada, 2007; Hynes, 2002; Legate et al., 2009). Por ello, las proteínas de ECM y estas estructuras desempeñan roles vitales en la determinación, diferenciación, proliferación, supervivencia, polaridad y migración de las células (Discher et al., 2009; Geiger et al., 2009).

B. Anosmina-1

Anosmina-1 es una glicoproteína secretable de ECM codificada por el gen *KAL1*, con capacidad de unirse a FGFR1. Por sus características bioquímicas se la puede clasificar como una proteína de adhesión convencional, aunque más allá de los aspectos clásicos con que ha sido relacionada, distintos estudios llevados a cabo en los últimos años han demostrado su implicación en procesos muy diversos del desarrollo del SNC. Anosmina-1 consta de 680 aminoácidos con una disposición modular de sus distintos dominios. Contiene una región rica en cisteínas (dominio CR); un dominio (WAP) similar al encontrado en inhibidores proteín-serina; cuatro dominios fibronectina de tipo III (FnIII) presentes en otras ECM y otras moléculas de adhesión celular y una región C-terminal con un alto contenido en residuos básicos de histidinas y prolinas (**Figura 14**; Legouis et al., 1993).

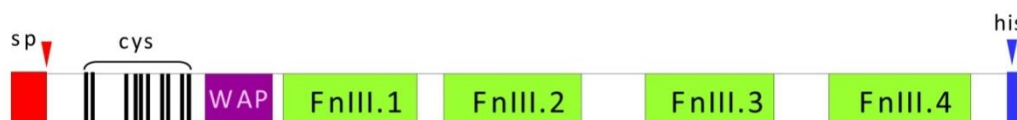


Figura 14. Estructura de la proteína anosmina-1. Presenta un péptido señal en su extremo N' terminal, seguido de una región rica en cisteínas, un dominio WAP, cuatro dominios de tipo fibronectina-III y junto a su extremo C', un dominio rico en histidinas.

a. El gen *KAL1*

El gen responsable de la forma ligada al sexo del síndrome de Kallmann (ver más adelante el apartado sobre este síndrome de Kallmann), *KAL1*, fue identificado por vez primera en 1991 (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991). Este gen presenta 14 exones, se encuentra localizado en el cromosoma X (Xp22.3), aunque un homólogo inactivo ha sido hallado en el cromosoma Y (del Castillo et al., 1992), lo cual, junto con el hecho de que este gen escapa parcialmente a la inactivación del cromosoma X (Franco et al., 1991), explicaría la mayor prevalencia de la enfermedad en hombres

(Dodé et al., 2003).

b. Expresión de *KAL1* y anosmina-1. Regulación del gen *KAL1*.

En humanos, el patrón de expresión del gen *KAL1* y anosmina-1 ha sido estudiado por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Se han detectado transcritos de *KAL1* a las 5 semanas del desarrollo del embrión y la expresión de la proteína ha sido descrita restringida en la base de las membranas y matrices intersticiales de zonas embrionarias discretas, como suele ocurrir para las proteínas ECM. Otras estructuras que expresan *KAL1* en el desarrollo son diferentes estructuras del sistema olfativo, la retina, el cerebelo, la médula espinal, el oído interno, el riñón y los testículos, correlacionándose con la distribución de las anomalías clínicas más significativas en pacientes con síndrome de Kallmann (Hardelin et al., 1999). Aunque no se ha descrito la expresión de transcritos *KAL1* y anosmina-1 en neuronas GnRH positivas, ambos se encuentran presentes en las fibras nerviosas y en la ruta que siguen estas neuronas en su migración hacia el hipotálamo (Hardelin et al., 1999).

Dentro del sistema olfativo, la expresión de *KAL1* ha sido descrita en distintas especies. En humanos, se ha observado su presencia en la capa del nervio olfativo del BO, en interneuronas de la capa granular y en células gliales (Duke et al., 1995; Lutz et al., 1994). En otras especies como la rata, el pollo o el pez cebra, su expresión dentro del BO ha sido descrita en neuronas de proyección de las capas mitrales, así como en interneuronas de las capas plexiforme externa y glomerular, en el TOL y en la corteza piriforme (Ardouin et al., 2000; Ayari y Soussi-Yanicostas, 2007; Ayari et al., 2012; Clemente et al., 2008; Dellovade et al., 2003; Lutz et al., 1994; Soussi-Yanicostas et al., 2002; Yanicostas et al., 2009).

Otra región en la que *KAL1* se expresa es el cerebelo en fetos humanos (Lutz et al., 1994), así como en otras especies tales como la rata, la musaraña, el pollo y el pez cebra, asociada a células de Purkinje, neuronas de los núcleos profundos y de la capa granular interna y a astrocitos (Ardouin et al., 2000; Ayari et al., 2012; Clemente et al., 2008; Dellovade et al., 2003; Gianola et al., 2009; Legouis et al., 1993; Rugarli et al., 1993; Soussi-Yanicostas et al., 1996; Soussi-Yanicostas et al., 2002). Más recientemente, la expresión de *KAL1* ha sido descrita en células musculares, en células de cultivos de músculo esquelético de humanos, en la capa basal de la piel, en células de la dermis tales como células vasculares endoteliales, fibroblastos y keratinocitos cultivados de origen humano (Raju y Dalakas, 2005; Tengara et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito expresión de anosmina-1 en las células germinales de los testículos durante la espermatogénesis y en las células granulosas y en los oocitos de ovarios maduros en el marsupial ualabí, lo cual sugiere que, además del papel regulador en la migración de neuronas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) y en consecuencia, del hipogonadismo hipogonadotrópico (uno de los síntomas del

síndrome de Kallmann), *KAL1* también podría estar localizado en las gónadas, regulando la espermatogénesis y la foliculogénesis (Hu et al., 2011).

Aparte del hecho de que *KAL1* escapa parcialmente el mecanismo regulador de la inactivación del cromosoma X (Franco et al., 1991), poco se sabe acerca de la regulación y del control de la expresión de este gen. En los últimos años se ha observado regulación de la expresión de *KAL1* en distintos tipos de tumores, en líneas celulares y en enfermedades inflamatorias, sugiriendo una posible función de anosmina-1 en la patogénesis de algunas de ellas. Distintos factores tales como la hipoxia, la metilación de sitios CpG en el promotor del gen y en moléculas implicadas en procesos inflamatorios podrían estar relacionados con la regulación de la expresión del gen *KAL1* (Arikawa et al., 2011; Jian et al., 2009; Kawamata et al., 2003; Mihara et al., 2006; Raju y Dalakas, 2005; Tengara et al., 2010).

c. Mecanismos de acción de anosmina-1

Se sabe que anosmina-1 interacciona con otras proteínas de la ECM (laminina, fibronectina, anosmina-1) y, entre otras proteínas receptoras de membrana, la mejor conocida hasta la fecha es su interacción con FGFR1 y la modulación de la activación de dicho receptor (Ayari y Soussi-Yanicostas, 2007; Bribián et al., 2006; Dodé et al., 2003; González-Martínez et al., 2004; Hu et al., 2009). La interacción entre anosmina-1 y FGFR1 ha sido descrita por co-inmunoprecipitación (Ayari y Soussi-Yanicostas, 2007; Bribián et al., 2006; González-Martínez et al., 2004) y se ha determinado que, por un lado, los dominios WAP y FnIII.1 en conjunto y, por otro, el dominio FnIII.3 interaccionan con FGFR1 (Hu et al., 2009). Por ello, no resulta sorprendente que algunas de las mutaciones antisentido encontradas en el gen *KAL1* en pacientes de síndrome de Kallmann se hallen dentro de los dominios FnIII implicados en la interacción FGFR1 (N267K, E514K, F517L), impidiendo o reduciendo en buena parte su interacción con el receptor (Cariboni et al., 2004; Hu et al., 2009). Además, distintas mutaciones dentro del dominio WAP, también descritas en pacientes de KS, podrían estar implicadas en el correcto plegamiento de la proteína ya que es necesario que dicho dominio permanezca intacto para la adecuada función biológica de anosmina-1 (**Figura 15A**; Bulow et al., 2002; González-Martínez et al., 2004; Hu et al., 2004).

Por otro lado, también se ha demostrado la interacción de anosmina-1 con otros componentes de la ECM, tales como uPA (Hu et al., 2004), fibronectina, laminina y anosmina-1 a través de interacciones homofílicas (Bribián et al., 2008). Aunque algunos de los dominios implicados en la interacción con FGFR1 participan en la unión a estas proteínas, las mutaciones halladas en FnIII.3 que impiden la unión de anosmina-1 a FGFR1 tienen un efecto menor en la unión a fibronectina y laminina. Estos datos, junto con que el dominio FnIII.4 también participa en la unión a anosmina-1, sugieren un mecanismo de acción independiente de FGFR1 (**Figura 15B**).

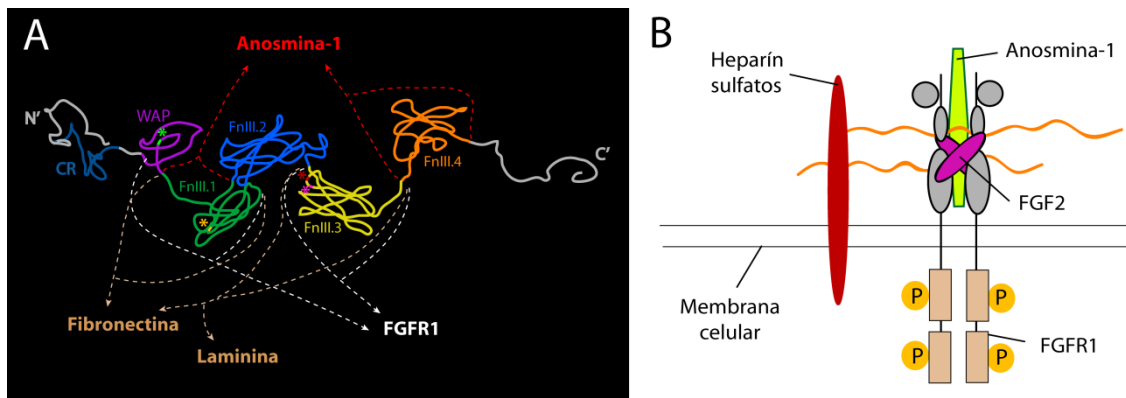


Figura 15. (A) Representación de la estructura de anosmina-1 en 3D y de los dominios que intervienen en su interacción con otras proteínas (laminina, fibronectina, FGFR1 y la propia anosmina-1). Los asteriscos simbolizan la localización de determinadas mutaciones que han sido descritas en pacientes del Síndrome de Kallmann y que están implicadas en la interacción con dichas proteínas. **(B)** Esquema del complejo formado por FGFR1-A1-FGF2-HS.

Existen 5 motivos potenciales de unión a HSPG a lo largo de la secuencia de anosmina-1 que parecen importantes para la correcta localización de la proteína dentro de la ECM (Robertson et al., 2001) y 6 sitios putativos de N-glicosilación (Rugarli et al., 1993) cuya repercusión en la función de anosmina-1 aún no han sido esclarecidos, aunque las repeticiones FnIII parecen jugar un papel crucial en su unión a HS y en la interacción con otras proteínas (Robertson et al., 2001). La interacción de anosmina-1 con HS presentes en la ECM parece también importante para la localización y la unión de anosmina-1 a la ECM (Hu et al., 2004; Soussi-Yanicostas et al., 1996) y la interacción entre anosmina-1 y sindecán-1 y glipican-1 regula la migración de neuroblastos en el embrión de *C. elegans* (Hudson et al., 2006). Tanto FGFR1 como anosmina-1 requieren de HSPG para sus funciones biológicas respectivas, habiéndose descrito que los HSPG son esenciales para la formación general del complejo FGF-FGFR y la activación del receptor (Guimond y Turnbull, 1999; Hu et al., 2004; Soussi-Yanicostas et al., 1996). Se ha hipotetizado que, debido a su naturaleza difusible, anosmina-1 ejercería papeles opuestos en función de las dinámicas de unión a los complejos FGF2-FGFR1-HS. De este modo, la unión previa de anosmina-1 con HS para después juntarse con FGF2-FGFR1, parece que facilitaría la señalización del complejo FGF2-FGFR1-HS. En este escenario, cuando los niveles de anosmina-1 son elevados, la anosmina-1 que queda sin unirse a HS podría difundir libremente por la superficie de la célula y obstaculizaría la formación del complejo FGF2-FGFR1-HS (**Figura 15B**; Bribián et al., 2006; Hu et al., 2009).

d. Efectos biológicos de anosmina-1

1. Anosmina-1 en la migración celular

Como proteína clásica de ECM, anosmina-1 está implicada en la adhesión celular al sustrato y en la migración celular. Este es el caso de las neuronas GnRH-1, sobre las cuales anosmina-1 desempeña un efecto quimioatrayente. Ensayos realizados en

células GN11 (neuronas migrantes inmortalizadas GnRH-1 de origen humano) demostraron que la anosmina-1 con mutaciones halladas en pacientes de KS es incapaz de inducir la migración de dichas células (Cariboni et al., 2004). Por otro lado, se ha visto que anosmina-1 juega un papel diferente en la migración: en células precursoras de oligodendrocitos, la concentración relativa de anosmina-1 y FGF2 modula la migración de células precursoras de oligodendrocitos en el nervio óptico durante el desarrollo, así como en la corteza de ratón adulto, inhibiendo el efecto motogénico de FGF2 a través de FGFR1 (Bribián et al., 2006; Clemente et al., 2011). Dicho efecto se encuentra íntimamente relacionado con la adhesividad celular y, en este tipo celular, anosmina-1 presenta un efecto adhesivo más potente que laminina y fibronectina, reduciendo la motilidad celular por tanto (Bribián et al., 2008). En células precursoras de oligodendrocitos, el mecanismo de acción de anosmina-1 es doble independiente de FGFR1 y sólo está mediado por interacciones a otras proteínas de ECM (laminina o fibronectina, incluyendo a la propia anosmina-1 por interacciones homofílicas (Bribián et al., 2008). La migración de células precursoras de oligodendrocitos desde regiones de oligodendrogénesis a sus emplazamientos finales es fundamental para la correcta mielinización y función general del SNC (de Castro y Bribián, 2005).

2. Crecimiento axonal y formación de colaterales

El primer efecto biológico descrito para anosmina-1 fue su función como sustrato promotor del crecimiento de neuritas en neuronas de cerebelo en ratones postnatales (Soussi-Yanicostas et al., 1998). En ese estudio, mediante co-cultivos con anosmina-1 expresada por células CHO se demostró una reducción en el crecimiento de neuritas y una inducción en su fasciculación. En ratas, anosmina-1 atrae los axones de las neuronas de proyección del BO (células mitrales y empenachadas) que forman el TOL durante el desarrollo (Soussi-Yanicostas et al., 2002). Además, anosmina-1 incrementa la ramificación de los axones de las neuronas de proyección del BO y ejerce un efecto quimioatrayente sobre ellos desde la corteza piriforme (Soussi-Yanicostas et al., 2002). Efectos similares se han observado en el cerebelo, donde anosmina-1 promueve la elongación de neuritas e incrementa la aparición de ramas colaterales y la extensión de las colaterales axónicas en células de Purkinje durante el desarrollo embrionario final y en un proceso de regeneración (Gianola et al., 2009). En neuroblastos GnRH de embriones humanos (células FNC-B4), anosmina-1 induce crecimiento de neuritas y una reorganización del citoesqueleto a través de mecanismos dependientes de FGFR1 (González-Martínez et al., 2004).

3. Efectos de anosmina-1 en otros vertebrados

Se han encontrado dos ortólogos del gen KAL1 en teleósteos: *kal1a* y *kal1b*, que codifican para anosmina-1a y anosmina-1b, respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que sólo anosmina-1a es esencial para la migración de neuronas GnRH en

pez cebra y en medaka (Okubo et al., 2006; Whitlock et al., 2005). Además, mientras que *kal1a* y *kal1b* muestran distintos patrones de expresión durante el desarrollo del pez cebra, ambos genes se encuentran fuertemente expresados en otra población celular que migra desde el primordio lateral posterior (Ardouin et al., 2000), para lo cual anosmina-1 es crítica (Yanicostas et al., 2008). En concreto, anosmina-1 parece jugar un papel clave en la correcta activación de las vías de señalización de CXCR4b/SDF1a y/o CXCR7/SDF1a (Yanicostas et al., 2008). En cuanto al sistema olfativo en pez cebra, la ausencia de anosmina-1 desorganiza la fasciculación de los axones olfativos y su llegada a su destino final en el BO. En este sentido, la inactivación de *kal1a* induce una drástica disminución del número de neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas en el BO (Yanicostas et al., 2009).

4. Funciones de anosmina-1 en invertebrados

En el nematodo *C. elegans*, el ortólogo de anosmina-1 es *kal-1*. En esta especie, *kal-1* está implicado en dos importantes eventos en la morfogénesis epitelial: el cierre ventral y la formación de la cola en el macho (Rugarli et al., 2002). De este modo y al igual que en mamíferos, *kal-1* afecta al crecimiento de neuritas *in vivo* al modular su grado de ramificación (Rugarli et al., 2002). Por otro lado, también promueve la migración de neuroblastos ventrales anterior al cierre epidermal (Hudson et al., 2006). Sin embargo, en este caso, *kal-1* no modula la señalización de FGF en la migración de neuroblastos, sino que parece que interacciona con múltiples HSPGs a la hora de estimular la migración celular.

e. Implicación de anosmina-1 en enfermedades

1. Anosmina-1 en el síndrome de Kallmann

El síndrome de Kallmann es una compleja enfermedad del desarrollo genéticamente heterogénea, caracterizada principalmente por el hipogonadismo hipogonadotrópico y la anosmia, y su prevalencia se ha estimado en hombres alrededor de 1:10.000 y en mujeres en 1:40.000 (Seminara et al., 1998; Dodé y Hardelin, 2009). La presencia de un sentido del olfato defectuoso, ya sea parcial (hiposmia) o completo (anosmia) distingue al síndrome de Kallmann del hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático de tipo normósico (nIHH), el cual puede verse asociado a mutaciones en los genes GnRHR y GPR54. Debido a una deficiencia en neuronas GnRH hipotalámicas, los varones con síndrome de Kallmann presentan criptorquidia, atrofia testicular y microfalia en el nacimiento, con el consiguiente fallo a la hora de desarrollar una pubertad normal durante la adolescencia. Las hembras con síndrome de Kallmann normalmente presentan amenorrea primaria o infertilidad.

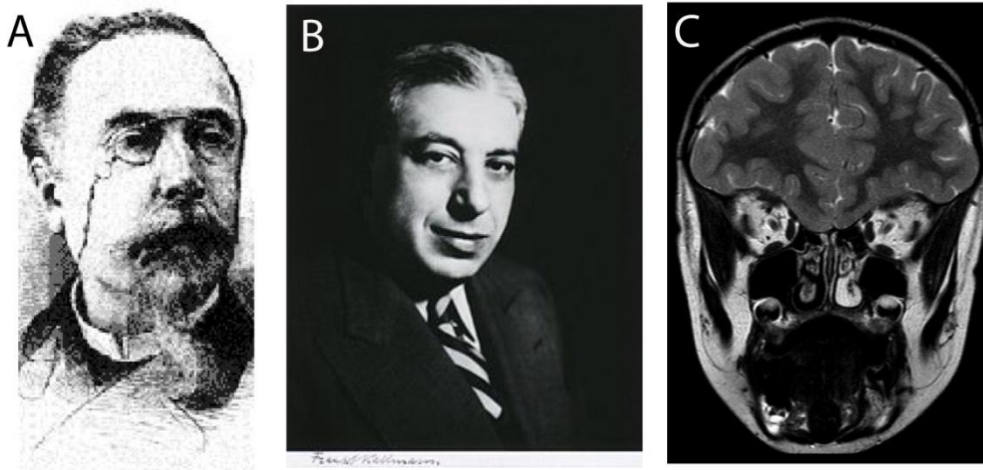


Figura 16. (A) Dr. Aureliano Maestre de San Juan; (B) Dr. Franz Joseph Kallmann; (C) Resonancia magnética de un paciente de síndrome de Kallmann con agenesia de los BOs (Vogl et al., 1994).

El síndrome de Kallmann fue descrito por vez primera en 1856 por el patólogo español Aureliano Maestre de San Juan y fue definido entonces como “la asociación de la presencia de testículos pequeños [hipogonadismo hipogonadotrópico] con una alteración [anosmia o hiposmia] del olfato” (**Figura16**; Maestre de San Juan, 1856). Una descripción más detallada del síndrome fue publicada casi un siglo después en pacientes con estos mismos síntomas y se determinó su naturaleza hereditaria junto con diversos síntomas satélites (**Figura16**; Kallmann et al., 1944). En 1954, de Morsier anotó el nexo entre el hipogonadismo y diversos defectos neuroanatómicos, incluidos la agenesia del BO y del TOL, así como alteraciones a nivel de la línea media (de Morsier, 1954). Desde entonces, es comúnmente aceptado que el hipogonadismo hipogonadotrópico del síndrome de Kallmann es causado por el fallo migratorio de las neuronas GnRH-1, que no consiguen entrar en el telencéfalo (**Figura 17**; Hayes et al., 1998; Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Wray et al., 1989). Dicho fallo migratorio repercute en la normal funcionalidad del hipotálamo, el cual no produce la hormona peptídica GnRH-1, que estimula la secreción de las hormonas hipofisarias (FSH y LH) estimuladoras de las hormonas sexuales (gonadotropinas; Wray et al., 1989). Sin embargo, en el caso de la hiposmia/anosmia, un amplio espectro de defectos anatómicos podría ser responsable de la falta de olfato, yendo desde la agenesia o hipoplasia de los BOs hasta defectos en la formación del nervio olfativo o del TOL, incluyendo otras causas que podrían explicar problemas sensoriales (**Figura16**).

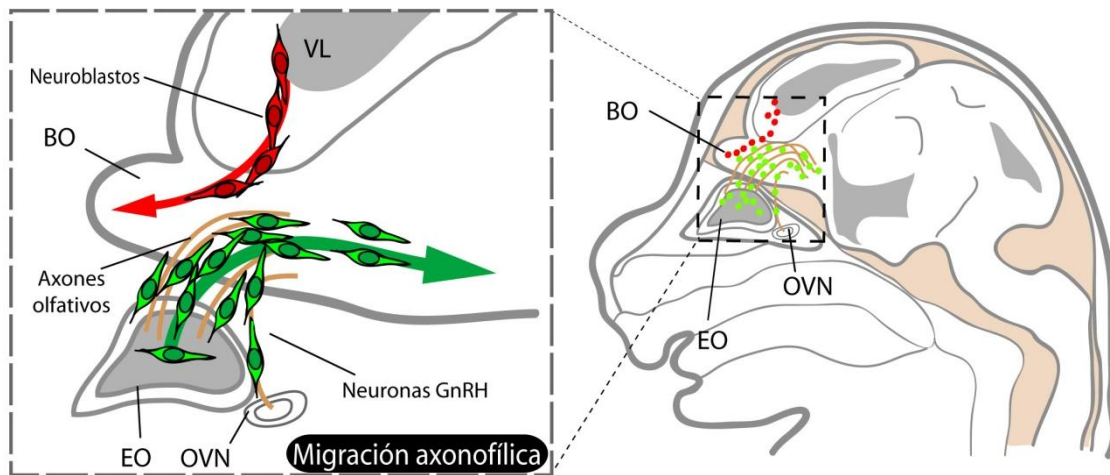


Figura 17. Migración de neuronas GnRH⁺ a E15. Durante el desarrollo embrionario, los neuroblastos GnRH⁺ generados a E10,5 en la placoda olfativa migran asociados a los axones olfativos que entran en el BO y alcanzan así el telencéfalo para posteriormente dirigirse hacia el área preóptica y al hipotálamo, donde llegan a E17-E18. Su fallo en la migración producido por mutaciones en los genes *KAL1* o *KAL2* provoca la aparición del Síndrome de Kallmann (ver el texto para más detalles).

Existen distintos modos de transmisión de síndrome de Kallmann descritos hasta la fecha, que incluyen los siguientes tipos de herencia: ligada al sexo (cromosoma X) recesiva, autosómica recesiva, autosómica dominante con penetrancia incompleta y, muy probablemente, la oligogénica o digénica (Dodé y Hardelin, 2009). Se han identificado múltiples causas genéticas relacionadas con el desarrollo de esta enfermedad: *KAL1*, *FGFR1*, *PROK2*, *PROKR2*, *NELF*, *KISSR1*, *CHD7*, *SEMA3A* y *FGF8* (Dodé et al., 2003; Dodé et al., 2006; Falardeau et al., 2008; Kim et al., 2008; Legouis et al., 1991; Pitteloud et al., 2007; Young et al., 2012). Otro gen relacionado con síndrome de Kallmann es *KAL2*, que codifica para *FGFR1* y es responsable de su variante autosómica dominante (Dodé et al., 2003). Mientras que distintas mutaciones en *FGFR1* han sido descritas en distintos dominios funcionales de este receptor, numerosas correlaciones genotipo-fenotipo han mostrado la asociación de manifestaciones clínicas asociadas con síntomas satélite de síndrome de Kallmann, tales como la pérdida del cartílago nasal, problemas de oído y anomalías en las extremidades que parecen estar relacionadas con mutaciones en *KAL2* (Dodé et al., 2003; Dodé y Hardelin, 2009). El papel de *FGFR1* en el desarrollo normal del BO explicaría la asociación de la anosmia con la deficiencia de neuronas GnRH-1 en pacientes con *FGFR1* mutado. El análisis de sus fenotipos indica que *FGFR1* se encuentra implicado en la adecuada migración de neuronas GnRH-1, aunque otros factores no conocidos hasta la fecha podrían estar involucrados puesto que existe una proporción significativa de individuos con *KAL2* mutado que presentan normosmia y una deficiencia en GnRH-1 (Martin et al., 2011).

Sin embargo, trabajos recientes indican que la señalización de *FGFR1* es importante para la generación de neuronas GnRH-1 a través de la molécula *FGF8* (Chung et al., 2010). Curiosamente, *FGFR1* es expresado por las neuronas GnRH-1 (Gill et al., 2004) y

animales hipomorfos para FGFR1 presentan una drástica reducción en el número de estas neuronas (Chung y Tsai, 2010). Además, se ha demostrado que FGF8 está implicado en la inducción y diferenciación de la placoda nasal en ratón (Kawauchi et al., 2005) y que la pérdida de este morfógeno resulta en la ausencia del órgano vomeronasal y de neuronas GnRH-1 (Chung y Tsai, 2010). Junto con esto, la región de la placoda nasal a partir de la cual emergen las células GnRH-1 no se forma en ratones homocigotos hipomorfos de FGF8 (Kawauchi et al., 2005). En este sentido, hallazgos recientes han demostrado que anosmina-1 promueve la formación de la cresta neural y controla, junto con otros factores de crecimiento, la actividad de FGF8 durante el desarrollo (Endo et al., 2012; Kawauchi et al., 2005). Sin embargo, merece la pena mencionar que, puesto que la región entera de la placoda olfativa se encuentra ausente en estos ratones, el impacto real de estas moléculas en el desarrollo de las neuronas GnRH-1, así como de sus precursores, todavía ha de ser dilucidado.

2. Anosmina-1 en otras enfermedades

Más allá del síndrome de Kallmann, trabajos recientes han puesto de manifiesto el papel que desempeña anosmina-1 en otras enfermedades, como la esclerosis múltiple y el desarrollo de diversos tipos de tumores.

La esclerosis múltiple es la forma más frecuente de desmielinización en jóvenes adultos y sus lesiones se caracterizan por desmielinización, inflamación, daño y pérdida axonal y gliosis activa (Frohman et al., 2006). En este sentido, se ha descrito que anosmina-1 y FGF2 se encuentran expresados selectivamente en los distintos tipos de lesiones desmielinizantes presentes en la esclerosis múltiple humana y que desarrollan un papel importante en el reclutamiento de precursores de oligodendrocitos endógenos (Clemente et al., 2011).

Por último, se ha puesto de manifiesto recientemente la relación entre anosmina-1 y cáncer. Por ejemplo, ha sido descrita su alta expresión en cáncer de mama comparado con tejido sano (Arikawa et al., 2011), mientras que en la línea celular metastatizante de carcinoma escamoso esofágico de humanos, *KAL1* se halla *down-regulated* con respecto a la línea no cancerosa (Arikawa et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión del gen *KAL1* juega un papel importante en la metástasis y en la protección por parte de la célula tumoral frente al proceso apoptótico (Jian et al., 2009). Distintos mapeos de ADNc de tejido canceroso de colon, pulmón y ovario indicó una bajada significativa de la expresión de *KAL1* en comparación con tejido sano. Además, en líneas celulares de cáncer de colon, TGF- β induce la expresión del gen *KAL1* y la secreción de anosmina-1. En este aspecto, resulta muy interesante que la hipoxia induce la expresión de anosmina-1 pero en cambio, protege a las células cancerosas de sufrir apoptosis e incrementa la motilidad de las células cancerosas (Jian et al., 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Anosmina-1 es una glicoproteína de matriz extracelular cuyos efectos han sido descritos en numerosos procesos del desarrollo del SNC y, en especial, en el sistema olfativo. Diversos estudios han demostrado que esta proteína interacciona con FGFR1 y activa su señalización. Además, es capaz de modular la acción de FGF2 cuando éste se une también a FGFR1. FGF2 es un factor de crecimiento conocido, sobre todo, por sus efectos pleiotrópicos como agente angio, moto y mitogénico. En concreto, se ha descrito su papel como potente mitógeno sobre las células progenitoras neurales de los nichos neurogénicos durante el desarrollo y en el adulto, como la zona subventricular del cerebro anterior (SVZ).

Por otro lado, cuando se encuentran mutados los genes que codifican para anosmina-1 o para FGFR1, aparece en humanos el síndrome de Kallmann, en el que se asocian anosmia e hipogonadismo hipogonadotrópico. Una de las causas descritas para la anosmia en este síndrome es el desarrollo defectuoso del bulbo olfativo en estos pacientes. Otras mutaciones asociadas al síndrome de Kallmann como, por ejemplo, en el gen que codifica para prokinetina-2, dan lugar a un severo fallo en la migración de los precursores de interneuronas que migran desde su nicho neurogénico, en la SVZ, hasta su lugar de destino final en el bulbo olfativo.

Por todo ello, nos hemos planteado como hipótesis de este trabajo que anosmina-1 y, por extensión, el sistema que forma con FGF2 y FGFR1, desempeñe una función relevante en la neurogénesis del sistema olfativo, en general, y, concretamente, en la migración de precursores neuronales desde la SVZ al bulbo olfativo, tanto durante el desarrollo como en el adulto, ya que ésta última es una de las escasas regiones de neurogénesis en el SNC maduro.

El objetivo global de este trabajo es, por tanto, el análisis del papel de anosmina-1 en la neurogénesis del sistema olfativo durante el desarrollo y en el SNC adulto, y puede desglosarse en los siguientes objetivos concretos:

- 1- Estudio del patrón de expresión de anosmina-1 y FGF2 en la SVZ y en las poblaciones que componen este nicho neurogénico durante el desarrollo embrionario y postnatal.
- 2- Determinar el efecto de anosmina y FGF-2 en la neurogénesis de la SVZ y en la subsiguiente migración de los precursores de interneuronas desde la SVZ al bulbo olfativo durante el desarrollo embrionario y postnatal.
- 3- Estudio del efecto de la sobreexpresión de anosmina-1 en el sistema olfativo del individuo adulto en una cepa de ratón transgénico que sobreexpresa dicha proteína.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Modelo animal y su manipulación

A. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO

La elección de la rata y del ratón (*Rattus norvegicus* y *Mus musculus*; Muridae, Rodentia, Mammalia) como modelo de estudio estuvo motivada porque en ambas especies se da un interesante proceso de forma amplia y sostenida tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto, que es la neurogénesis en la zona subventricular, con la consiguiente migración de neuroblastos a bulbo olfativo, y por ciertas facilidades prácticas como su pequeño tamaño, fácil manejo y corto ciclo reproductivo. Además, la gran cantidad de trabajos que han utilizado esta especie para el estudio del sistema nervioso, permite el acceso a modelos de todo tipo y a una enorme variedad de referencias relacionadas con todos los aspectos, que sin duda alguna resultaron decisivas para este estudio.

B. DESARROLLO DE LA RATA Y DEL RATÓN

El periodo de gestación de la rata dura 22 días y el del ratón, 19 días, considerando el día en que se visualizó el tapón vaginal como día embrionario (E)0,5 y el parto como día postnatal (P)0.

C. PROCEDENCIA Y CONDICIONES DE CRÍA

En este trabajo se han utilizado embriones de ratas (estadio E14-E17), ratas postnatales (P5-P15) de la cepa *Wistar* y ratones postnatales recién nacidos (P0) y adultos de la cepa C57BL/6, procedentes del animalario del Hospital Nacional de Parapléjicos y de las empresas *Charles River Laboratories*, *Harlan Laboratories* y *Janvier*, cuando fue necesario. En estas instalaciones, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50 \pm 10\%$), en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto comercial esterilizado por irradiación.

Todos los experimentos realizados en este estudio se sometieron a la evaluación del comité de bienestar animal del Hospital Nacional de Parapléjicos (SAPA001). Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la legislación española (RD223/88) y europeas vigentes (86/609/ECC) y fueron aprobados por la Comisión de Cuidado Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos.

D. GENERACIÓN DEL RATÓN TRANSGÉNICO DE SOBREEXPRESIÓN DE ANOSMINA-1.

La secuencia humana de ADNc de *KAL1* fue utilizada para generar una línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1 bajo el control del promotor humano de la β -actina, llevado por el vector pBAP (Gunning et al., 1987), amablemente cedido por el Dr. Lino Tessarollo (NCI, Frederick, USA), seguido por una secuencia IRES y el ADNc de la proteína fluorescente EGFP como reportero. La EGFP facilitó la detección en ratones

por *Western blot*. La inyección del ADN y la generación de los animales fundadores fue llevada a cabo en la Unidad de Generación de Organismos Modificados Genéticamente del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, España. El genotipado mediante PCR fue desarrollado a partir de ADN genómico de la cola, utilizando los siguientes cebadores:

hKalexon11: 5'-GGTGACTGTCCAACCAATACG-3';

hKalexon12: 5'-GGAAGGCAGAATCTGGGACTG-3';

EGFP15: 5'-GCGACGTAAACGGCCACAAG-3';

EGFP23: 5'-CGGTCACGAACTCCAGCAGG-3'.

El patrón de expresión de GFP en la línea transgénica fue examinado por *Western blot* de la proteína GFP.

II. Histología

A. PROCEDIMIENTO GENERAL

Los animales utilizados en este estudio fueron perfundidos intracardiamente con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4), seguido de paraformaldehído 4% (PFA) en tampón fosfato 0,1M (PB, pH 7,4). Las cabezas de los embriones y los cerebros de los animales postnatales y adultos fueron post fijados en el mismo agente durante 24 (embriones) ó 4 horas (postnatales y adultos) y posteriormente lavados en abundante PB al menos tres veces. En tejido fue crioprotegido por inmersión en sacarosa 30% (peso/volumen) en PB hasta su hundimiento. Para su posterior procesamiento, el tejido primero fue incluido en bloques de gelatina, después congelado mediante inmersión en isopentano a -55 °C y finalmente almacenado a -80 °C hasta su uso. El tejido embrionario fue cortado en un criostato (Leica) a 20 µm, mientras que el tejido postnatal se cortó a 40 µm. En el caso del tejido de ratón destinado a cuantificaciones estereológicas, los cerebros fueron cortados a 60 y 70 µm en un microtomo de deslizamiento (Leica) y posteriormente almacenados a -20 °C en solución crioprotectora.

Para marcaje inmunohistoquímico, las secciones fueron lavadas varias veces con PB y fueron pretratadas para inactivar las peroxidasas endógenas en solución con H₂O₂ (3%) y metanol (10%) en PB durante 20 minutos. Las secciones se lavaron en PB y se preincubaron durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Vector Laboratories) y detergente Triton-X-100 al 0,2% ó 0,5% (Merck) diluidos en PBS. El marcaje se llevó a cabo incubando el tejido durante una noche a 4 °C en la misma solución que el bloqueo junto con los anticuerpos primarios, tal y como se detalla en la **Tabla 1**.

El marcaje del anticuerpo primario fue detectado con el respectivo anticuerpo secundario biotinilado IgG (1:200; Vector Laboratories) en la misma solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y con el kit Vectastain Elite ABC (1:200 en PBS con Triton X-100 al 0.2%; Vector Laboratories).

Nombre	Especie	Conc.	Origen	Nombre	Especie	Conc.	Origen
FGF2	conejo	1:250	Santa Cruz (sc-1390)	BrdU	ratón	1:750	Abcam (ab1893)
Anosmina-1 (kal1)	conejo	1:500	Orbigen (PAB-10758)	BrdU	rata	1:200	Acris (SM1667PS)
Anosmina-1 (anos1)	conejo	1:1000	Dr. Augusto Silva (CIB-CSIC)	Histona H3 (PH3)	conejo	1:200	Abcam (ab5176)
FGFR1	conejo	1:200	Santa Cruz (sc-121)	Caspasa-3 activa	conejo	1:100	Abcam (13847)
FGFR1	conejo	1:200	Cell signaling (9740)	Lectina de tomate (TL)	--	15 mg/mL	Sigma-Aldrich (L0651)
GFAP	conejo	1:500	DAKO (Z0334)	Nestina	ratón	1:500	BD (556309)
GFAP	ratón	1:500	Millipore (MAB3402)	Tubulina acetilada	ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (T6793)
Vimentina	cabra	1:500	Santa Cruz (sc-7557)	γ-tubulina	cabra	1:200	Santa Cruz (sc-7396)
Vimentina	ratón	1:100	Hybridoma Bank (40E-C)	β-catenina	ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (C2206)
Olig2	conejo	1:200	Millipore (AB9610)	NeuN	ratón	1:100	Millipore (MAB377)
B-III tubulina (clon Tuj1)	ratón	1:1500	Millipore (MAB5564)	Calbindina (CB)	ratón	1:15000	Swant (CB-38a)
B-III tubulina (clon Tuj1)	ratón	1:500	Covance (MM-S435-P)	Parvalbúmina (PV)	conejo	1:200	Swant (PV235)
Doblecortina (DCX)	cabra	1:200	Santa Cruz (sc-8066)	Calretinina (CR)	conejo	1:5000	Swant (7699/3H)
PSA-NCAM	ratón	1:10	Hybridoma Bank (5A5)	Tirosina hidrox. (TH)	oveja	1:1000	Millipore (AB1542)

Tabla 1: Relación de los anticuerpos utilizados.

La reacción fue revelada con 3,3-diaminobencidina (DAB; 0,0125%; Sigma-Aldrich) y H₂O₂ (0,003%) en Tris-HCl, pH 7,6 y con sulfato amónico de níquel en la solución en algunos casos. El curso de dicha reacción fue observado al microscopio y se paró mediante el lavado de los cortes en PB. Muestras control de tejido fueron incubadas sin el anticuerpo primario y no se observó marcaje. La tinción de núcleos y la contratinción para perfiles celulares fueron llevados a cabo con tinciones clásicas de Nissl y de azul de toluidina. Por último, las secciones fueron deshidratadas en series de alcoholes (70%, 80%, 90%, 96%, y 99%), limpiadas con xilol y fueron montadas con medio de montaje Entellan (Merck) y un cubre.

En el caso de inmunofluorescencia, el procedimiento fue el mismo hasta la incubación con el anticuerpo secundario, omitiendo la preincubación para inactivar las peroxidases endógenas. En dicho punto, se usaron los correspondientes anticuerpos secundarios: Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 (1:1000; Invitrogen) a temperatura

ambiente durante una hora. Tras varios lavados en PBS, los cortes fueron inmersos en solución de Hoechst 33342 (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) para marcar los núcleos. Las secciones inmunofluorescentes fueron montadas en portas con medio de montaje acuoso Fluoromont (Southern Biotech) y un cubre.

B. INYECCIONES DE BrdU

Los ratones adultos ($n=4$ ratones/grupo; P60) recibieron cuatro inyecciones intraperitoneales de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) cada dos horas en un mismo día (300 mg/kg de peso corporal, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich; (Ahmed et al., 2008). Para todos los grupos experimentales, los animales se sacrificaron y perfundieron 20 días después de las inyecciones y, entonces, se recogieron los cerebros para ser procesados histológicamente, como se ha descrito anteriormente.

C. CUANTIFICACIONES ESTEREOLÓGICAS

El uso de esta aproximación estereológica nos dio datos consistentes con varianzas dentro de cada muestra y entre los grupos de muestreo que resultaron estadísticamente aceptables. De este modo, mediante la estereología se eliminan potenciales diferencias de muestreo y un sesgo en el proceso de seleccionar las zonas a evaluar (Peterson, 1999).

Estimación volumétrica. El volumen total del BO y el de cada capa que lo conforma fue estimado ($n=7$ ratones/grupo) mediante el programa informático NewCast (Olympus), basado en el principio de Cavalieri (Cavalieri, 1955).

Recuentos celulares. Se llevaron a cabo estimaciones de la densidad de células NeuN ($n=6$ ratones/grupo), CB ($n=4$ /grupo), CR ($n=5$ /grupo), TH ($n=4$ /grupo) y PV ($n=3$ /grupo) inmunorreactivas mediante el disector óptico, basado en el uso de un diseño de muestreo sin sesgo (Gundersen et al., 1988). Dicho análisis estereológico se realizó con un microscopio Olympus que cuenta con una unidad de control monitorizada asociada al programa informático NewCAST, que permite un control preciso en los ejes y-, x- y z-. Cada capa correspondiente (granular, plexiforme externa o periglomerular) fue delineada con un objetivo 2x para cada una de las secciones contrateñidas con azul de toluidina de 70 micras de grosor. Series de seis secciones de BO, regularmente espaciadas a intervalos de 420 µm y cubriendo por completo la estructura se usaron para estos recuentos. A partir de una posición inicial aleatoria, un marco de recuentos aparece en pantalla sobre la imagen del tejido y las neuronas son así contadas bajo el objetivo 100x. Las células inmunorreactivas fueron tenidas en cuenta cuando el soma se encontraba enfocado y no estaba en contacto con las líneas de exclusión del marco de recuento. Se utilizó un marco de muestro de $1.204,7 \mu\text{m}^2$ con una distancia de separación entre cada uno de 352,18 µm o 248,03 µm en los ejes x- e y-, en función de la forma de la capa analizada. El disector contó con una profundidad de 15 µm en el eje z- y se dejó un margen de exclusión de 4 µm de

distancia de los bordes de las superficies superior e inferior. Un mínimo de 100 células se muestrearon en cada caso, de acuerdo con las reglas del disector óptico y el coeficiente de error fue lo suficientemente bajo.

Por otro lado, se estimaron las células BrdU positivas en el BO entero de un modo similar en secciones parasagittales de 60 μm de grosor para cuantificar el número relativo de células que, habiendo incorporado el marcador de proliferación, alcanzaron el BO desde la SVZ tras los 20 días desde las inyecciones, asumiendo así que gran mayoría son neuronas jóvenes (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002).

Otros recuentos de células

Para evaluar las densidades de células inmunorreactivas PH3^+ y $\text{PH3}^+/\text{DCX}^+$ en la SVZ ($n=3$ ratones/grupo), se llevó a cabo un método ciego de recuento estandarizado en el microscopio confocal con escáner resonante TCS SP5 (Leica) a un aumento de 40x. Para todos los casos, cuatro grupos de imágenes en 3D fueron capturados con una distancia entre cada plano de 0,7 μm en el eje z- elegidos al azar en el canal de los núcleos teñidos con Hoechst. De este modo se examinaron al menos cinco secciones representativas a lo largo del eje anteroposterior de un grosor de 20 μm en cada cerebro para tres animales por genotipo.

D. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

Los ratones adultos (P80; $n=3$ ratones/grupo) fueron anestesiados y perfundidos a través del ventrículo izquierdo del corazón con PBS, seguido de 100 ml de fijador Karnovsky (PFA 2%, glutaraldehído 2,5%) para microscopía electrónica convencional. Los cerebros fueron postfijados en el mismo fijador hasta el día siguiente a 4°C. Se realizaron secciones de 200 μm de grosor que a su vez se postfijaron en osmio (2%) durante 90 minutos. A continuación, se procedió a su lavado, deshidratación e inclusión en Araldita (Fluka, Sigma-Aldrich). Secciones seriadas semifinas de 1,5 μm de grosor fueron teñidas con azul de toluidina y examinadas en un microscopio óptico para estudiar la organización general de la SVZ. Después, secciones ultrafinas de 70 nm de grosor se cortaron con una cuchilla de diamante, se marcaron con citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico Spirit (FEI Tecnai).

E. DISECCIÓN *WHOLE-MOUNT* DE SVZ, INMUNOMARCAJE Y MICROSCOPÍA

Tras la dislocación cervical de ratones adultos (P80; $n=3$ ratones/grupo), los hemisferios se extrajeron con rapidez y se separaron en medio L15 (Invitrogen) a 4°C. Se quitó el cerebelo y a continuación, el hipocampo y el septo fueron retirados desde la parte caudal del telencéfalo. De este modo, las paredes de los ventrículos laterales quedaron expuestas y fueron fijadas por inmersión en PFA (4%) con Triton X-100 (0,1%) a 4°C. Tras su marcaje, las paredes de los ventrículos fueron disecadas del parénquima circundante y quedaron como rodajas de tejido de 200-300 μm de grosor

para ser montadas en portas con medio Fluoromount G (SouthernBiotech). Para más detalles consultar (Mirzadeh et al., 2010a).

Los anticuerpos primarios y secundarios fueron incubados en PBS con Triton X-100 (1%) y NDS (10%) durante 24 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: ratón anti- tubulina acetilada (1:1000, Sigma-Aldrich T6793), cabra anti- γ -tubulina (1:200, Santa Cruz sc-7396), conejo anti- β -catenina (1:1000, Sigma-Aldrich C2206), ratón anti-GFAP (1:500, Millipore MAB3402), ratón anti-vimentina (1:500, Santa Cruz sc-7557), conejo anti-histona fosforilada H3 (1:200, Abcam). Por otro lado, los anticuerpos secundarios conjugados fueron Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647 (1:500, Invitrogen). Posteriormente, se procedió a su análisis en un microscopio confocal con escáner resonante TCS SP5 (Leica).

III. Cultivos *in vitro*

A. Explantes de SVZ y co-cultivos con agregados de células CHO

Los cerebros de las edades E14, E17, P5 y P15 en ratas, y P0 en ratones, fueron extraídos rápidamente y colocados en medio L15 (Invitrogen) a 4°C. Se realizaron secciones coronales de 350-400 μ m de grosor con un *Tissue-chopper* (McIlwain) y la SVZ se disecó cuidadosamente con la ayuda de microagujas para preparar explantes de, aproximadamente, 200-300 μ m de diámetro. Para los cultivos de rata, como fuente de anosmina-1 se usó la línea celular CHO (CHOKal23d11) transfectada (CHO-A1) y células CHO sin transfectar (CHO-CT) como control (Bribián et al., 2006; Soussi-Yanicostas et al., 1996; Soussi-Yanicostas et al., 2002). La producción de anosmina-1 se comprobó por *Western blot*, como ya se describe más adelante (ver apartado Análisis de expresión de proteínas por *Western Blotting*). Tanto los explantes como los agregados de CHO-CT y CHO-A1 se incluyeron en colágeno de cola de rata (1:1), según lo descrito por otros autores (Alcantara et al., 2000; Bribián et al., 2006; Lumsden y Davies, 1986), y fueron cultivados durante 3 días *in vitro* (3 DIV) en medio DMEM-F12 (1:1; Invitrogen) complementado con SFB (5%), suero de caballo (HS; 5%) y antibiótico penicilina-estreptomicina (1%, Invitrogen) en un incubador a 37°C con CO₂ al 5% y un 95% de humedad.

Para los cultivos de explantes con FGF2, esta molécula fue diluida en el medio de cultivo a una concentración final de 20 ng/ml o bien, para los experimentos de quimiotaxis fue preincubado en microesferas de heparina (Sigma-Aldrich) durante una hora a la misma concentración, como ya se describió previamente (Bribián et al., 2006). Tanto los agregados de células CHO como las microesferas con FGF2 fueron colocados de los explantes de SVZ a una distancia constante de, aproximadamente, 300 μ m en todos los experimentos.

En el caso de los cultivos de tejido de ratón, no se añadió al medio de cultivo ninguna molécula quimiotrópica pues se trataba de evaluar comparadamente la motilidad intrínseca de los 3 fenotipos.

En todos los cultivos, un mínimo de 4 experimentos independientes fue llevado a cabo para cada condición y un mínimo de 60 explantes fue evaluado por condición.

Al cabo de los 3 DIV, los explantes fueron fijados en PFA al 4% durante 10 minutos. Para su análisis inmunocitoquímico, los explantes fueron incubados durante una noche a 4°C con la solución A (NDS al 1 %, Triton X-100 al 0.2 % en PBS) con diferentes anticuerpos primarios β -III tubulina (clon Tuj1; 1:500; Covance MM-S435-P o clon Tuj1; 1:1500; Millipore MAB5564); KAL-1 (1:500; Orbigen, PAB-10758); Anos1 (1:250; Clemente et al., 2008); GFAP (1:500; DAKO Z0334); PSA-NCAM Ab (1:10; clon 5A5, Hybridoma Bank), DCX (1:200; Santa Cruz sc-8066) y Olig2 (1:200; Millipore AB9610). Alternativamente, fueron incubados con los anticuerpos A2B5 (1:10; ATCC CRL-1520) o FGFR1 (1:200; Santa Cruz, sc-121) en la misma solución A sin el detergente Triton X-100. Tras varios lavados en PBS, los explantes fueron incubados con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a una proteína fluorescente (Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647; 1:1000, Invitrogen) y posteriormente, se les añadió solución con Hoechst 33342 (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) para marcar los núcleos.

B. Ensayos de proliferación

Para estudiar *in vitro* la proliferación de neuroblastos de SVZ, analizamos la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en las células de la SVZ de rata de edades E14, E17, P5 y P15, siguiendo un protocolo ya publicado (Merchán et al., 2007). Así, las SVZ de las distintas edades se disociaron en DMEM (Invitrogen) con tripsina (Invitrogen; 0,0025%) a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se añadió la enzima DNAsa (Invitrogen; 0,05%) durante 5 minutos. La tripsina fue bloqueada con SFB (10%) y las células se centrifugaron (160 x g; 5 min) para eliminar el sobrenadante. Se procedió a su recuento y se sembraron 20000 células por pocillo con medio de cultivo fresco sin BrdU ya descrito para explantes y las mismas condiciones. Tras 42h en cultivo, la BrdU fue añadida al medio de cultivo (a una concentración de 50 μ M) y después de 6h se renovó el medio hasta el final del experimento, 24h después. La incorporación de BrdU se detectó con el anticuerpo anti-BrdU (1:750; Abcam, ab1893) en PBS con gelatina (0,2%), Triton X-100 (0,3%) y SFB (5%). El anticuerpo primario fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado (1:200; *The Jackson Laboratories*) y estreptavidina conjugada con la proteína fluorescente fluoresceína (1:200; Jackson Laboratories). Para clasificar las células BrdU positivas, se añadieron los anticuerpos Tuj1 (1:500; Covance, MM-S435-P) y GFAP (1:500; DAKO, Z0334) junto con Hoechst 33342 (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich). A cada edad, 4 experimentos independientes fueron realizados en los que se incluyó un triplicado de cada condición en cada ocasión. Un mínimo de 10 campos elegidos al azar fue analizado para cada condición.

C. Ensayos de quimiotaxis

Los estudios de quimiotaxis fueron realizados en cámaras Boyden, también conocidas como *transwells* (poro de 8 μm de alto y de 12 mm de diámetro; Corning Costar). Las SVZ de ratas de edades E14, E17, P5 y P15, y de ratones recién nacidos P0 fueron disecadas en medio L15 frío y disociadas en DMEM (Invitrogen) con tripsina (Invitrogen; 0,0025%) a 37°C durante 30 minutos, seguido de DNAsa al (Invitrogen; 0,05%) durante 5 minutos. La tripsina fue bloqueada mediante SFB (10%) y tras su centrifugación (160 x g; 5 minutos) las células fueron recogidas y contadas. En el compartimento superior de cada cámara Boyden se sembraron 40000 células en el medio DMEM-F12 (1:1; Invitrogen) complementado con FBS (5%; Invitrogen), HS (5%; Invitrogen) y antibiótico penicilina-estreptomicina (1%; Invitrogen), mientras que en el compartimento inferior, el medio de cultivo se suplementó para los distintos grupos experimentales como se indica a continuación:

- a) Medio de cultivo solo;
- b) Medio de cultivo con extracto concentrado de células CHO-CT;
- c) Medio de cultivo con extracto concentrado de células CHO-A1;
- d) Medio de cultivo con FGF2 (20 ng/ml; RD)

Estas líneas celulares CHO [CHO control (CHO-CT) y CHO que expresan la proteína anosmina-1 entera con una cola HA en el extremo C' terminal (CHO-A1)], se usaron para preparar los extractos concentrados de proteínas de la ECM siguiendo un protocolo modificado previamente descrito (Soussi-Yanicostas et al., 1996). Brevemente, las células cultivadas fueron lavadas en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) libre de calcio y magnesio para, a continuación, ser incubadas durante 30 minutos a 4°C en un volumen de 1ml/placa de cultivo (10 cm de diámetro) en una solución con PB 20mM (pH 7,4), NaCl (350 mM) e inhibidor de proteasas EDTA (Roche). Los sobrenadantes de células CHO-CT y CHO-A1 se concentraron 10 veces utilizando Amicon Ultra-4 30K (Millipore). Durante el experimento, se añadieron dos bloqueantes generales de FGFRs: SB402451 (100 nM, cortesía del Dr. Bernard Zalc; ICM/Hôpital de la Salpêtrière, Paris) y SU5402 (10 μM ; Calbiochem-Merck). Los correspondientes experimentos control se llevaron a cabo añadiendo a los cultivos un volumen equivalente de DMSO (Sigma-Aldrich). Tras 20 horas de cultivo a 37°C en el incubador, los cultivos se fijaron con PFA al 4% (10 minutos a temperatura ambiente) y la presencia de neuroblastos migrantes en el compartimento inferior se evaluó mediante el marcaje con el anticuerpo contra β -III tubulina (clon Tuj1; 1:500; Covance MM-S435-P o Tuj1; 1:1500; Millipore MAB5564), mientras que los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich).

D. Ensayos de adhesión

Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo según protocolos ya descritos (Bribián et al., 2006; Prestoz et al., 2004). Las células disociadas de SVZ de ratón fueron resuspendidas en medio de cultivo con DMEM-F12 (1:1; Invitrogen) complementado con SFB (5%; Invitrogen), HS (5%; Invitrogen) y antibiótico penicilina-estreptomina (1%; Invitrogen) y sembradas a una densidad de 500 células/pocillo en placas de 60 pocillos (Nunc) que habían sido pretratadas con poli-L-lisina (Invitrogen) durante una hora y con sobrenadantes de células CHO-CT y CHO-A1 (para detalles sobre su extracción, ver apartado “Ensayos de quimiotaxis”). Tras una hora de incubación a 37°C, las células no adheridas fueron eliminadas mecánicamente con varios lavados y los cultivos se fijaron con PFA (4%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El total de células fue teñido con Hoechst 33342 (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) y los neuroblastos fueron marcados con el anticuerpo contra β -III tubulina (clon Tuj1; 1:1500; Millipore MAB5564). Tres experimentos independientes fueron llevados a cabo para cada condición, analizando 15 pocillos en cada caso.

IV. Análisis de expresión génica por PCR semicuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para la purificación de ARN a partir de tejido de cerebro, los animales fueron anestesiados y decapitados. Los cerebros de embriones de rata E14 y E17 y de ratas postnatales P5 y P15 fueron extraídos y se realizaron cortes coronales como ya se ha descrito en el apartado de “Cultivos *in vitro*”. La SVZ de cada animal fue disecada y el ARN total se extrajo utilizando Trizol, cloroformo e isopropanol. Una cantidad de 2 µg de ARN fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems) y la PCR semicuantitativa en tiempo real se realizó en ABI PRISM® 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos. Se usaron las siguientes sondas Taqman de ensayos de expresión génica: Rn 00577234_m1, Rn 01269940_m1, Rn 00584799_m1, Rn 01441013_m1 para FGFR1, -2, -3 y -4, respectivamente, y la GAPD de rata fue utilizada como control endógeno. La expresión relativa de ARNm de cada FGFR se determinó utilizando el método del umbral de ciclo comparativo (Ct) y sus valores se normalizaron respecto a la expresión de ARNm de GAPD para representar los resultados como Δ Ct. Para cada grupo de genes, tres series de experimentos se realizaron por triplicado.

En el caso de las muestras procedentes de ratón, se llevaron a cabo ensayos de qRT-PCR para los ARNm de anosmina-1 (*KAL1*) y tirosina hidroxilasa (th) utilizando las correspondientes sondas Taqman y nucleótidos (*KAL1*, Hs00608006_m1*; th, Mm00447557_m1* y Gapdh de ratón como control endógeno, Mm99999915_g1*). Respecto a las cuantificaciones, se procedió de manera análoga a lo descrito para rata. La expresión relativa de *KAL1* se normalizó con los menores niveles de expresión de los

ratones de la camada y se promedió para los animales heterocigotos y homocigotos. Los resultados de la expresión de *th* se calcularon normalizando respecto al grupo de ratones control o salvajes.

V. Análisis de expresión de proteínas por *Western blotting*

Para comprobar la presencia de la proteína reportera GFP y para estudiar la expresión de ERK y pERK comparada en ratones transgénicos P80 se realizó un inmunoblot. Los BO se disecaron y homogenizados en tampón de lisis: Nonidet P-40, complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) en PBS y fueron sometidos a varios pasajes a través de una jeringa insulina de 1 mL con una aguja de calibre 20G. La solución fue incubada en hielo (30 minutos) y centrifugada a 16.000 g durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteínas fue valorada por el método BCA (Pierce). Entre 10 y 30 µg de extractos de proteína se hirvieron en tampón Laemli's 2X (Sigma-Aldrich) y utilizados para el *Western blotting*. Las muestras fueron añadieron a un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL) y fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-ERK (1:2000; Santa Cruz sc-93) y anti-pERK (1:1000; Santa Cruz sc-7383), seguido de anticuerpos secundarios fluorescentes conjugados (680 ó 800 IRDye) que permitieron analizar las membranas con el escáner de infrarrojos Odyssey (LICOR) para cuantificar la cantidad de cada proteína mediante un análisis simultáneo de las proteínas en canales fluorescentes separados. Se representan los valores de la cantidad relativa de ERK y pERK respecto de la cantidad de ERK, normalizados respecto al valor relativo de ERK/pERK de los ratones control.

VI. Inyecciones de trazadores y estudio del TOL

Los axones eferentes del BO fueron marcados con el trazador dextranamina biotinilada (BDA) con peso molecular 10000 (Sigma-Aldrich). Los ratones adultos (P80) fueron anestesiados con una inyección intramuscular (i.m.) de una mezcla de clorhidrato de ketamina (36 mg/kg peso corporal; Sigma-Aldrich) y xilacina (6.2 mg/kg peso corporal; Rompun, Bayer). Con una aguja de calibre 35G y una jeringa *nanofil* (World Precision Instruments), se inyectó 1,5 µl de una solución de BDA al 10% en agua destilada (0,15 µl/min). El extremo de la aguja fue colocado 2 mm anterior a la sutura frontoparietal, 1 mm al lado de la línea media y 1,5 mm por debajo de la piamadre. Se administraron los correspondientes antibióticos profilácticos antes (cloramficol, 30 mg/kg i.m.) y después de la operación (gentamicina, 40 mg/kg i.m.). El dolor postoperatorio fue tratado con buprenorfina (0,03 mg/kg i.m.) durante 3 días. Entre 7 y 10 días después de la operación, los animales fueron anestesiados y perfundidos como ya se describió anteriormente (ver apartado "Histología"). Para cada telencéfalo, secciones de 60 µm fueron recogidas en series y tratadas durante 20 minutos en H₂O₂ al 1% en PBS y después incubadas hasta el día siguiente a 4°C en solución avidin-biotin-peroxidasa

(Vectastain kit, Vector Laboratories) en PBS con Triton X-100 (0,5%). El producto de la reacción se obtuvo con DAB (0,02%) y H₂O₂ (0,02%) en Tris-HCl (50 mM), pH 7.6. Las secciones fueron montadas en portas pretratados con gelatina, deshidratados en etanol, limpiados en xilol y montados con medio DPX (Fluka, Sigma-Aldrich).

VII. Experimentos de comportamiento

A. Discriminación espontánea de odorantes sintéticos. Para las tareas de discriminación, usamos una versión ligeramente modificada de los tests de habituación-deshabituación ya descritos (Gheusi et al., 2000; Lazarini et al., 2009; Yang y Crawley, 2009). Para estos experimentos, se emplearon jaulas de ratón limpias sin haber sido usadas. Los animales (10 controles, 10 heterocigotos y 9 homocigotos) fueron expuestos a odorantes colocados en bandejas de plástico (5x5 cm) con papel de filtro Whatman (2x2 cm) impregnado con 10 µl de una solución de concentración 0,4% de los correspondientes odorantes disueltos en aceite mineral (todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich). Dos días antes de cada experimento, los animales fueron sometidos a una sesión de familiarización con la jaula y el procedimiento, exponiéndolos a aceite mineral. Se situó a cada ratón en la jaula experimental durante 10 minutos con una exposición repetida a aceite mineral antes de cada exposición. En el primer paradigma, los ratones fueron expuestos cinco veces consecutivas a linalool (0,4%). En un segundo experimento con otros odorantes, este primer paradigma se integró en uno nuevo más complejo y los ratones fueron expuestos a distintos odorantes como se explica a continuación:

1. cuatro exposiciones consecutivas a un primer odorante (habituación);
2. una exposición a un segundo odorante similar pero distinto al primero, como por ejemplo, un enantiómero del mismo;
3. dos exposiciones al primer odorante de la habituación;
4. una última exposición a un odorante diferente (deshabituación).

Cada exposición duró 90 segundos, con intervalos de 2 minutos entre cada una. El tiempo total de exposición fue grabado con una videocámara y el tiempo que los animales investigaron activamente cada odorante. Se consideró que los animales habían reconocido un estímulo olfativo cuando pasaban significativamente menos tiempo investigando un odorante introducido en la jaula una segunda vez.

B. Memoria olfativa a corto plazo. Siguiendo el consejo de los Drs. Gilles Gheusi y Pierre-Marie Lledó, los ratones fueron expuestos al odorante mentol dos veces de 5 minutos cada una, con dos intervalos de espera distintos (15 y 30 minutos) entre sendas presentaciones de mentol. De igual manera que en el caso anterior, el experimento fue grabado y cuantificado posteriormente.

VIII. Cuantificaciones y análisis estadístico

A. Ensayos de adhesión: Tres experimentos independientes fueron realizados por grupo y condición, analizando 15 pocillos en cada caso.

B. Explantes: Para cuantificar la quimioatracción, con la ayuda del programa morfométrico ImageJ el campo fue dividido en cuatro cuadrantes ortogonales, donde se contabilizaron los cuadrantes proximales (CP) y distales (CD) con respecto al agregado de células CHO o a las microesferas de heparina con FGF2 (Alcantara et al., 2000; Ng et al., 2005; Paratcha et al., 2006). De este modo, se calcularon las áreas ocupadas por las células marcadas con Tuj1 fuera de los explantes, correspondientes a neuroblastos migrantes. En el caso de los análisis realizados en ratones, 4 experimentos fueron llevados a cabo para cada grupo, analizando un mínimo de 60 explantes en total por condición.

C. Análisis de Video-Time Lapse (VTL) y seguimiento celular: Las imágenes de los cultivos para el seguimiento fueron tomadas cada 20 minutos durante las primeras 48 horas del experimento con un microscopio de contraste de fase Olympus IX81, montadas y analizadas con los programas Cell-R, Olympus y ImageJ. La distancia migrada total se calculó como la suma de todas las trayectorias parciales medidas cada 20 minutos. Cuando la distancia recorrida entre dos imágenes era igual a cero, se consideró como una parada. La velocidad de la migración también fue calculada. Tanto en el caso de los cultivos de rata y ratón, dos experimentos independientes de seguimiento celular fueron llevados y 12 explantes fueron analizados por condición y experimento. Un total de unas 400 células por condición fue considerado para las cuantificaciones.

D. Quimiotaxis: Tras su marcaje, las membranas de las cámaras Boyden se examinaron con el programa *In Cell 1000 Analyzer* (software *In Cell 1000 Analyzer*; GE-HealthCare) y 16 imágenes para cada membrana fueron capturadas al azar. Para cuantificar el quimiotropismo, el número de neuroblastos transmigrados por campo fue contado con el programa *In Cell 1000 Analyzer Workstation* (GE-HealthCare). Los datos se representan como el porcentaje de neuroblastos migrantes por campo respecto a cada condición control, considerado como el 100%.

Los datos generales se presentan como la media \pm el error estándar. Los análisis han sido llevados a cabo de acuerdo con los test estadísticos de la *t* de Student correspondientes para muestras pareadas o independientes, análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos colas, o sus correspondientes tests por rangos para muestras no paramétricas. El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó con el paquete informático *Software Package Sigmaplot-Sigmaplot* (SPSS Inc.). Los niveles de significación mínimos estadísticos se definieron como significativos para * $p < 0,05$ en el caso de la ANOVA y, en el caso de la *t*-test de Student, se estableció como se detalla a continuación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

I. FGF2 y anosmina-1 se encuentran expresadas en la SVZ y la RMS

A pesar de que la expresión de FGF2 y anosmina en el telencéfalo rostral ya han sido estudiadas previamente tanto durante el desarrollo como en el adulto (Clemente et al., 2008; Frinchi et al., 2008; Monfils et al., 2006; Mudo et al., 2007; Soussi-Yanicostas et al., 2002; Vaccarino et al., 1999; Zheng et al., 2004), su localización en el sistema SVZ-RMS-BO durante el desarrollo no se conoce en detalle. El estudio de la expresión de ambas proteínas reveló su presencia en la SVZ y en la RMS a las distintas edades analizadas en rata (E14, E17, P5 y P15), habiéndose apreciado una mayor intensidad a P5, lo que coincide con el pico postnatal de migración (**Figura 18A-D**; Peretto et al., 2005). El inmunomarcaje mostró un gradiente caudo-rostral con una mayor expresión en la SVZ para ambas moléculas, atenuándose progresivamente a lo largo de la RMS (**Figura 18A-D**).

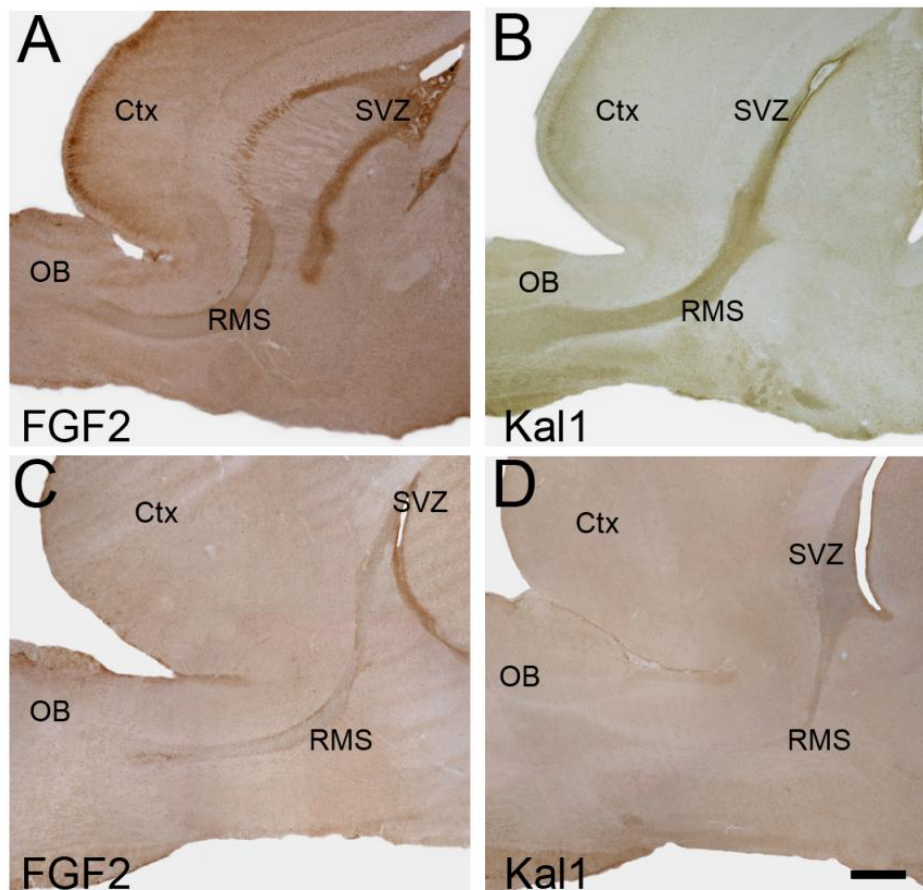


Figura 18. Expresión de FGF2 y anosmina-1 en la SVZ de ratas durante el desarrollo. (A-D) Secciones parasagitales de telencéfalo y BO de ratas a P5 (**A-B**) y a P15 (**C-D**). (**A**) Se observó un gradiente caudo-rostral de expresión de FGF2 en la SVZ y a lo largo de la RMS con una menor intensidad al llegar la RMS al BO. (**C**) La intensidad del marcaje de FGF2 mostró una disminución de marcaje a P15, con una localización mayor en la SVZ. También en el caso de anosmina-1, su marcaje fue mayor a P5 (**B**) que a P15 (**D**), con un gradiente caudo-rostral similar en la intensidad de su expresión. Abreviaturas: Ctx, corteza; OB, bulbo olfativo; RMS, ruta migradora rostral; SVZ, zona subventricular. Barra de escala: 480 μ m en **A-B** y 540 μ m en **C-D**.

En los cultivos disociados de la SVZ, anosmina-1 se encontró casi restringida a las células Tuj1⁺ (células A o neuroblastos), mientras que FGFR1 se encuentra expresado por casi todas las células, de un modo especialmente intenso en las células de la estirpe astrogial (GFAP⁺/Vimentina⁺; **Figura 19**).

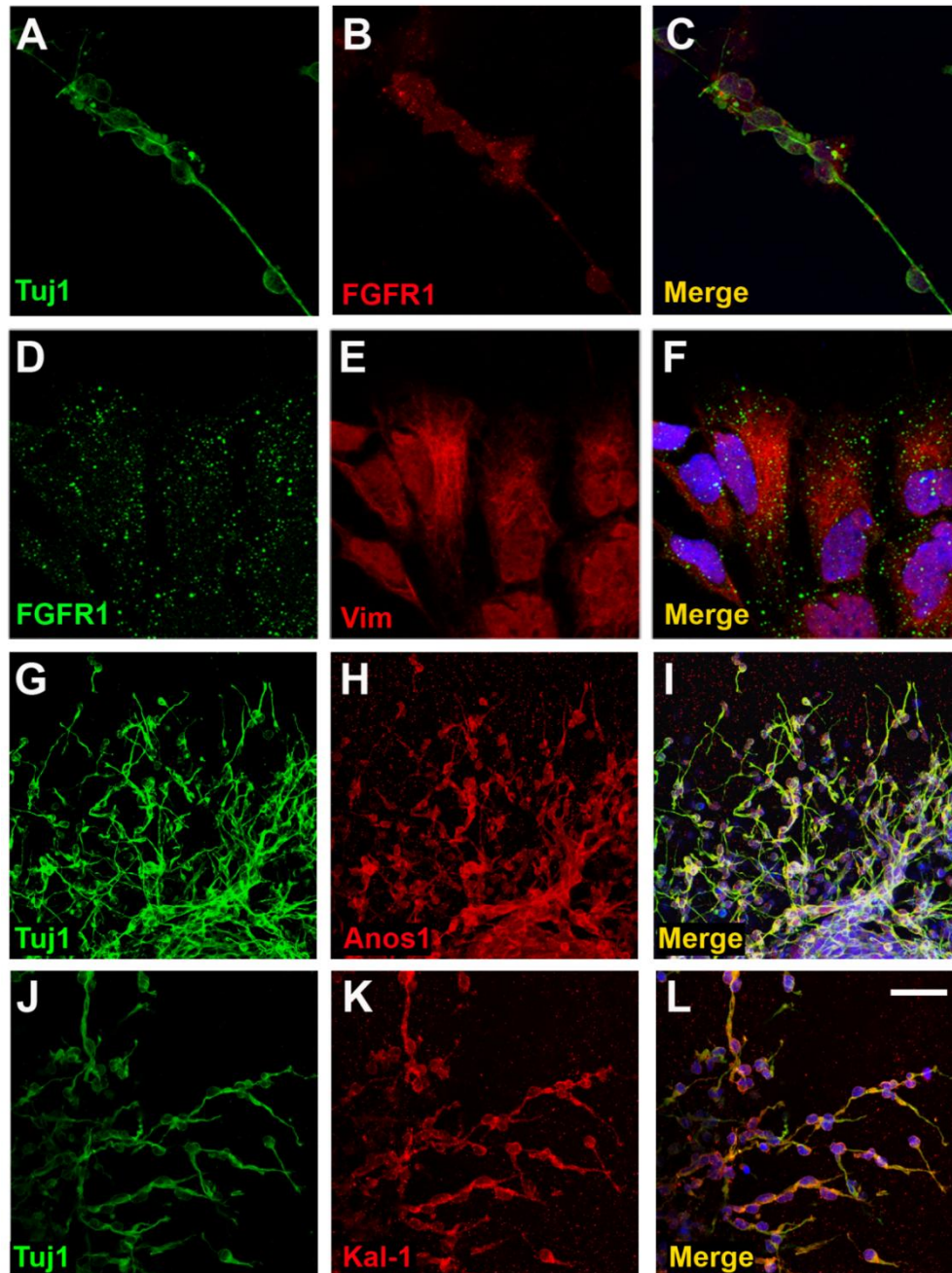


Figura 19. Expresión de FGFR1 y anosmina-1 en la SVZ de ratas durante el desarrollo. En cultivos de disociados de SVZ, los neuroblastos (A-C) y los astrocitos vimentina⁺ (D-F) de la SVZ expresaron FGFR1 a E17. En cultivos de explantes a P5, se vio una fuerte expresión de anosmina-1 en la mayoría de los neuroblastos de la SVZ (G-L). Barra de escala: 15 μ m en A-C, 10 μ m en E-F, 30 μ m en G-I y 25 μ m en J-L.

Además, a todas las edades estudiadas la práctica totalidad las células que migraron fuera de los explantes de SVZ a partir de cerebros de rata expresaban Tuj1, descartando casi totalmente la presencia de precursores de oligodendrocitos o de astrocitos que interfirieran en los experimentos de migración (datos no mostrados). Esta migración de precursores neuronales fue mayoritariamente de forma individual, si bien se observaron formaciones de cadenas de forma transitoria y en menor medida, como ya fue descrito (Wichterle et al., 1997).

Trabajos anteriores han sugerido que la proliferación en la SVZ inducida por FGF2 sucede a través de sus receptores FGFR1 y FGFR2 (Frinchi et al., 2008; Zheng et al., 2004). Por ello, realizamos un estudio detallado mediante qRT-PCR de la distribución relativa de ARNm de FGFRs en la SVZ para las cuatro edades estudiadas. Los datos obtenidos indican altos niveles de expresión de FGFR1, -2 y -3, muy por encima de FGFR4, el cual apenas se encontró presente (**Figura 20**). Cabe la pena destacar que la presencia de FGFR1 y -2 fue significativamente mayor que la de FGFR3 a partir de E17 (**Figura 20**). Estos datos confirman y amplían estudios previos no cuantitativos acerca de la expresión de FGFRs (Hasegawa et al., 2004; Vaccarino et al., 1999). En conjunto, estos datos demuestran que FGF2, sus receptores funcionales (sobre todo FGFR1 y -2) y anosmina-1 se encuentran presentes en la SVZ de rata desde E14 a P15, incluyendo las edades correspondientes a los picos de migración descritos (E17 y P5: Pencea y Luskin, 2003; Peretto et al., 2005).

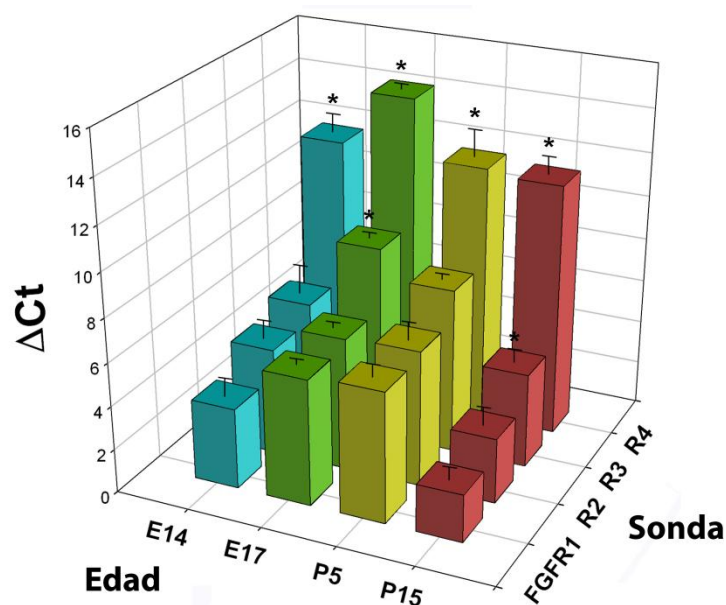


Figura 20. Análisis semicuantitativo de la expresión de ARNm de FGFRs en la SVZ de ratas (E14, E17, P5 y P15). A todas las edades estudiadas, se observó una expresión de FGFR4 prácticamente inexistente, mientras que FGFR1 y FGFR2 fueron siempre los dos receptores más expresados. La expresión de FGFR3 presentó unos niveles más bajos que FGFR1 y FGFR2, hecho repetido a todas las edades estudiadas. Se representan los resultados de un análisis ANOVA entre edades, *: $p < 0,05$.

II. FGF2 induce *in vitro* la migración de los neuroblastos de SVZ pre- y postnatalmente

Para analizar los efectos de FGF2 y anosmina-1 en la migración de los neuroblastos de la SVZ, se usaron explantes de SVZ embebidos en matrices de colágeno y en cultivos de células disociadas en cámaras *Boyden*. Cuando los explantes de SVZ se cultivaron en presencia de un gradiente de FGF2, mediante microesferas de heparina pretratadas con FGF2 (20 ng/ml), no se observaron diferencias en las áreas ocupadas por las células migratorias entre el cuadrante proximal (CP) respecto al cuadrante distal (CD), lo que sugiere que FGF2 no ejerció un efecto quimiotrópico sobre los neuroblastos (**Figura 21A-C**). La falta de diferencias en las distancias máximas migradas por las células en los CPs y CDs corroboró esta observación (**Figura 21D**). Sin embargo, a cada edad estudiada, los neuroblastos migraron mayores distancias en presencia de FGF2 en comparación con las condiciones control (**Figura 21D**). El aspecto de las células migratorias correspondió con la típica morfología de los neuroblastos en explantes de colágeno: células separadas con morfología uni o bipolar de forma mayoritaria, si bien a partir de E17 se comenzaron a observar de forma transitoria cadenas de células migrantes, compuestas de tres a doce células, siendo este hecho especialmente marcado a P5, similar a otros estudios previos (**Figura 21EF y 19G-L**; Luskin, 1993; Peretto et al., 2005; Wichterle et al., 1997). En ningún caso se vio que la presencia de FGF2 afectara a su apariencia (**Figura 21E-F**).

Por otro lado, cuando FGF2 fue añadido al medio de cultivo (20 ng/ml), se produjo un incremento significativo en el número de neuroblastos saliendo de los explantes a cada edad estudiada (**Figura 21G-I**), lo cual parece confirmar que FGF2 tiene un efecto motogénico sobre estas células. Además, dicho efecto motogénico se hizo evidente en estudios de *video time-lapse* (VTL), donde los neuroblastos en presencia de FGF2 recorrieron mayores distancias, a velocidades más elevadas y efectuando un menor número de paradas en comparación con la condición control (**Figura 21J-M; vídeos suplementarios 1 y 2**). En ambas condiciones se produjo un incremento en la migración de neuroblastos a E17 y P5 similar a lo descrito por otros autores (**Figura 21C, I**; Pencea y Luskin, 2003; Peretto et al., 2005). Aunque el conjunto de estos datos apunta a que FGF2 es una molécula motogénica a todas las edades estudiadas, sin que ejerza efecto quimiotrópico alguno, resultó llamativo el incremento del número de células que salieron de los explantes con FGF2 presente, lo cual sugiere un efecto mitogénico adicional.

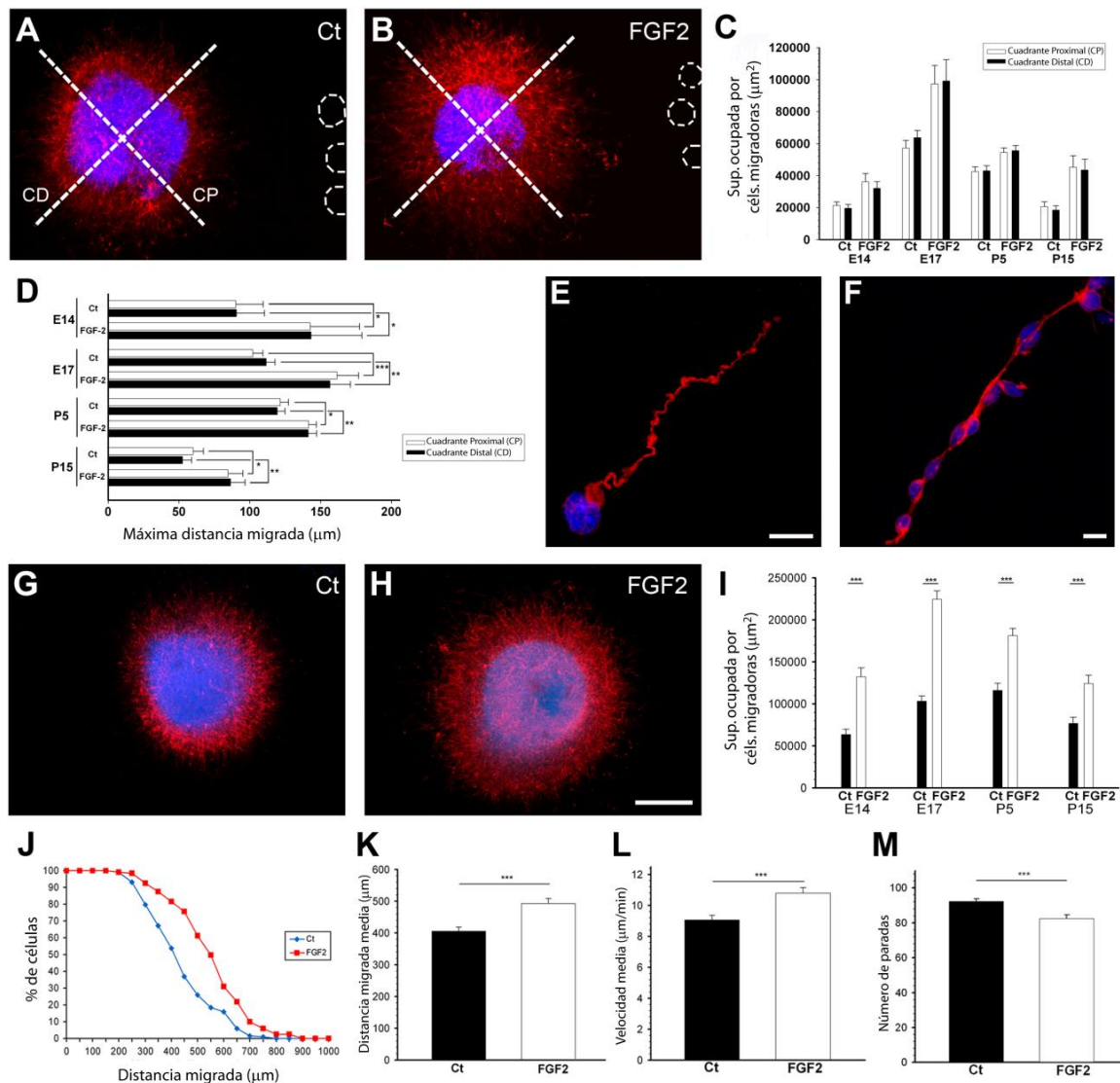


Figura 21. FGF2 ejerce un efecto motogénico sobre los neuroblastos migradores de SVZ durante el desarrollo. (A-C) A todas las edades analizadas, los neuroblastos que migraban fuera de los explantes siguieron un patrón radial por igual en ambas condiciones, con lo que la presencia del gradiente de FGF2 no afectó a la direccionalidad de dicha migración (las microesferas con FGF2 están marcadas con líneas discontinuas). Análogamente, la distancia máxima migrada por los neuroblastos en ambas condiciones fue igual entre los cuadrantes proximal (CP) y distal (CD), siendo siempre mayor con FGF2 que en condiciones control (D). Los neuroblastos migraron mayoritariamente de forma individual (E), aunque también lo hicieron en formaciones de cadenas de forma transitoria y con menor frecuencia (F). Cuando FGF2 fue añadido en el medio de cultivo, se observó un incremento en el número de neuroblastos migradores, reflejando un efecto motogénico de FGF2 (G-I). Dicho efecto fue corroborado por *video time-lapse* y se observó que, en presencia de FGF2, el porcentaje de neuroblastos que migró mayores distancias fue mayor (J), que estas células recorrieron distancias más largas (K), a más velocidad (L) y efectuando un número de paradas menor (M) en comparación con la condición control. Los resultados de *t*-test pareados (C-D) y/o *t*-test de Student (D, I, K-M) se representan: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$. La barra de escala representa 200 μm en A-B y G-H, 10 μm en E y 20 μm en F.

III. Anosmina-1 posee un efecto quimioatrayente sobre neuroblastos de SVZ pre- y postnatalmente *in vitro*

Al igual que en el caso de FGF2, se analizó el efecto de anosmina-1 sobre la migración de neuroblastos de SVZ, sin que indujera cambio morfológico alguno en ellos. Cuando se realizaron co-cultivos de anosmina-1 en presencia de un gradiente de anosmina-1 producido por agregados de células CHO-A1 (**Figura 22A**), las áreas ocupadas por los neuroblastos migratorios en los CP respecto a los CD fueron mayores, mientras en los grupos control la migración fue radial (CP=CD; **Figura 22B-D**). Este efecto fue observado a cada edad estudiada, aunque dicha quimioatracción fue menor a E14 (**Figura 22D**). Al igual que en el caso de FGF2, la superficie relativa ocupada por neuroblastos migratorios fue mayor a las edades de E17 y P5, lo que confirma observaciones previas realizadas *in vivo* (Pencea y Luskin, 2003; Peretto et al., 2005). De acuerdo con el efecto quimiotrópico canónico, la presencia de anosmina-1 produjo que las distancias máximas migradas por neuroblastos en el CP fueran mayores que en el CD a todas las edades estudiadas, observando también mayores distancias máximas en los CPs en presencia de anosmina-1 respecto a los CPs control (**Figura 22E**).

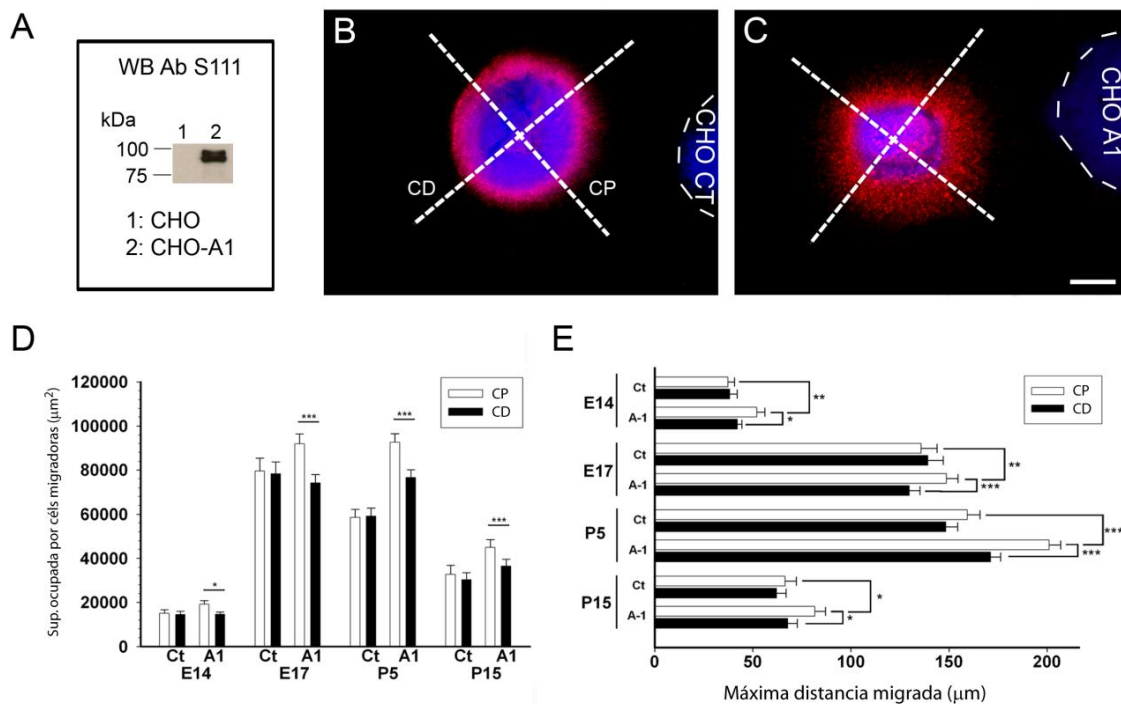


Figura 22. La anosmina-1 tiene un efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de SVZ de rata durante el desarrollo. Mediante *Western blot* de muestras de medio de cultivo concentrado se comprobó la presencia de anosmina-1 en células CHO-A1 pero no en células CHO-CT (**A**). A todas las edades estudiadas, en explantes de SVZ co-cultivados con agregados de células CHO se vio que los neuroblastos fueron atraídos hacia la fuente de anosmina-1, siendo mayor el área del cuadrante proximal (CP) que en el cuadrante distal (CD), e iguales en la condición control (**B-D**). El análisis de las distancias máximas migradas por estas células confirmó la quimioatracción de anosmina-1 (**E**). Se representan los resultados de *t*-test pareados (**D-E**) y/o *t*-tests de Student (**E**): *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$. Barra de escala: 160 μm en B-C. Los explantes de las imágenes proceden de ratas E17.

IV. Estudio de los receptores de FGF2 y anosmina-1 implicados en la migración de neuroblastos de SVZ

El estudio de la expresión de ARNm de FGFRs en la SVZ determinó que FGFR1 y FGFR2 son los que tienen una mayor presencia (**Figura 20**), aunque parece que FGFR1 sea el más directamente implicado en la proliferación y migración en el SNC durante el desarrollo y en el adulto (Bribián et al., 2006; Frinchi et al., 2008; Gritti et al., 1999; Mudo et al., 2007; Vescovi et al., 1993). Para el análisis de a través qué receptores actúan FGF2 y anosmina-1, se llevaron a cabo experimentos de quimiotaxis en cámaras Boyden (o *transwells*) añadiendo dos inhibidores distintos de FGFRs (SB402451 y SU5402) en el medio de cultivo (**Figura 23A-B**). A todas las edades estudiadas, el efecto de FGF2 fue anulado en presencia de ambos inhibidores (**Figura 23A**), confirmando datos ya descritos de su mecanismo de acción.

Por el contrario, la quimioatracción inducida por anosmina-1 no fue bloqueada del todo en las edades prenatales en presencia de SU5402, mientras que con SB402451 sí se produjo una supresión total de su efecto (**Figura 23B**). Este hecho sugiere que durante el desarrollo embrionario otros receptores también podrían estar implicados en su acción, y/o que estas diferencias puedan deberse a la distinta especificidad de los inhibidores utilizados.

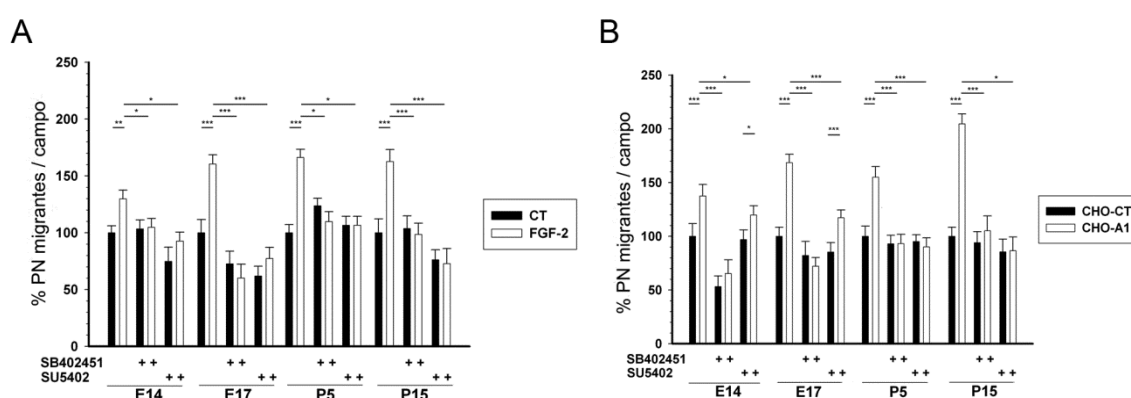


Figura 23. Análisis de los receptores implicados en la acción de FGF2 y anosmina-1. Se observó un incremento en la migración de precursores neuronales (PN) en presencia de FGF2, que fue neutralizada cuando se añadieron los bloqueantes de FGFRs SB402451 y SU5402 (**A**). La quimioatracción de anosmina-1 observada en explantes se confirmó con este ensayo a todas las edades estudiadas (**B**). Dicho efecto desapareció totalmente en presencia del inhibidor SB402451 y en parte con SU5402 (**B**). Los resultados del ANOVA (para todos los grupos a cada edad) y el *t*-test de Student dieron datos coincidentes, con lo que se representa este último: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$.

V. FGF2 aumenta la proliferación en la SVZ de células de estirpe no neuronal

Con el fin de evaluar el adicional efecto mitogénico potencial de estas moléculas y que la mayor migración de neuroblastos observada pudiera ser debida a un incremento en la proliferación, se realizaron experimentos de proliferación *in vitro* a todas las edades estudiadas que consistieron en la cuantificación de células que incorporaron BrdU en cultivos de disociados de SVZ. La mayoría de células BrdU⁺ presentaba núcleos de gran tamaño y fueron identificadas como GFAP⁺/vimentina⁺, mientras que muy pocas resultaron ser neuroblastos Tuj1⁺ (**Figura 24A-I**). El conocido mitógeno FGF2 tuvo un fuerte incremento de proliferación a todas las edades estudiadas, mientras que anosmina-1 indujo una leve tendencia pro-mitogénica que no alcanzó a ser significativa (**Figura 24J**). Además, el porcentaje de neuroblastos en proliferación se vio significativamente reducido en presencia de FGF2, mientras que se vio constante en los cultivos con anosmina-1 en el medio (**Figura 24K**). En conjunto, estos datos *in vitro* indican que FGF2 incrementó la tasa de proliferación general en la SVZ a todas las edades estudiadas, principalmente en células de la estirpe astrogial (glía radial y astrocitos) pero no en neuroblastos, y que anosmina-1 no tuvo efecto en la proliferación en la SVZ. Por lo tanto, la falta de efecto de FGF2 sobre la proliferación de neuroblastos descarta que el efecto mitogénico obtenido sea debido, al menos directamente, a una “contaminación mitogénica”.

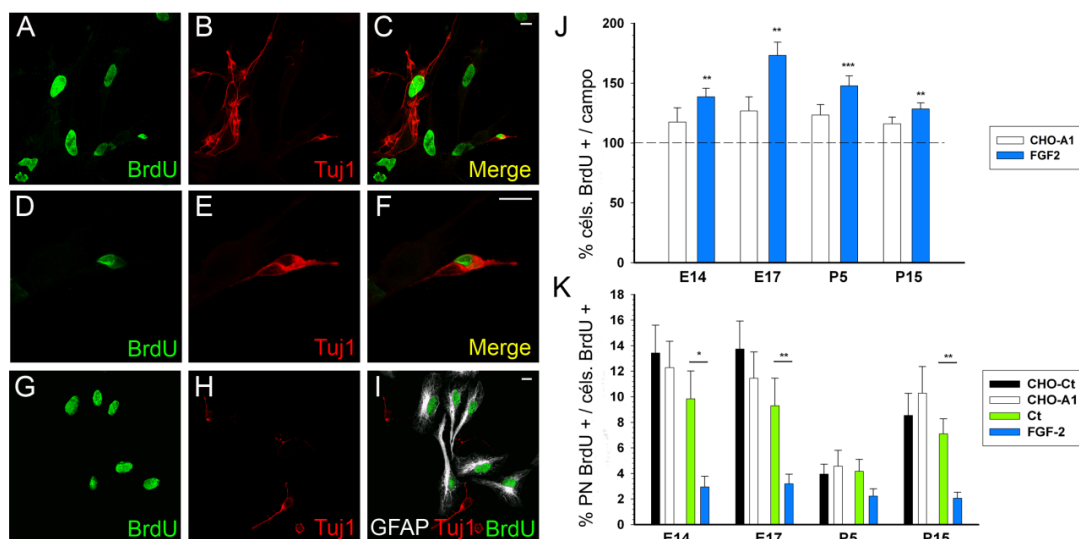


Figura 24. Análisis *in vitro* de la proliferación en células disociadas de SVZ. (A-I) Imágenes de células disociadas de SVZ de ratas P15. (D-F) Detalle de un neuroblasto en proliferación. Mientras que unos pocos neuroblastos incorporaron BrdU, la mayoría de las células que proliferaron fueron GFAP⁺ (G-I). La presencia de FGF2 en el medio de cultivo aumentó el número de células en proliferación a todas las edades estudiadas, mientras que anosmina-1 no afectó a la proliferación (**J**). Todos los porcentajes están relativizados con su condición control, representados como 100%. Debido al efecto diferencial de FGF2 sobre los neuroblastos y las células astrocitarias (**A-I**), el número relativo de neuroblastos que incorporó BrdU disminuyó significativamente (**K**). Los resultados de los *t*-test de Student se representan: *: *p*<0,05, **: *p*<0,01 y ***: *p*<0,001. Barra de escala: 10 μm en A-I.

VI. Generación de la línea de ratones transgénicos de sobreexpresión de anosmina-1

Con el fin de definir el papel general que juega anosmina-1 en el SNC, en el laboratorio hemos generado una nueva línea de ratón transgénico que sobreexpresa el ADNc del gen *KAL1* de origen humano. El fragmento completo de dicho ADNc que codifica para anosmina-1 se situó bajo el control del promotor de β -actina seguido por una secuencia IRES y otra del ADNc de la proteína fluorescente EGFP, como reportera (Figura 25A).

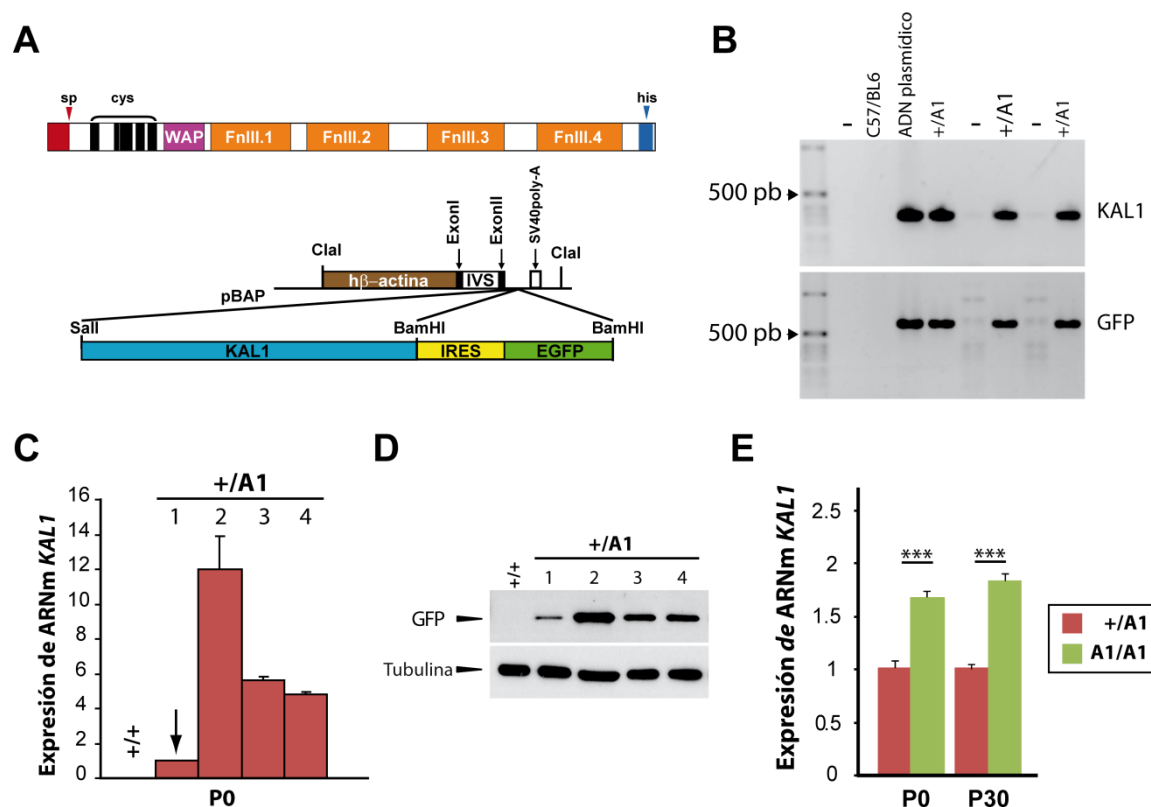


Figura 25. Caracterización inicial del ratón transgénico de sobreexpresión de anosmina-1. (A) Estructura de la proteína anosmina-1 y del transgén construido. El ADNc humano *KAL1* fue utilizado para generar la línea de ratón transgénico que sobreexpresa anosmina-1 bajo el control de regiones reguladoras y del promotor del gen de humano de la β -actina insertado en el vector pBAP. Junto con el ADNc de *KAL1*, se insertó a continuación una secuencia IRES y el ADNc de la proteína fluorescente EGFP como reportera. (B) La *cassette* de inserción fue detectada por genotipado mediante PCR de los ADNc de *KAL1* y GFP. (C) Para el análisis de qRT-PCR, se extrajo ARNm de cerebros de ratones recién nacidos P0. Se realizó un análisis cuantitativo para la secuencia humana de *KAL1* y se usó el gen *gapdh* de ratón como control endógeno. (D) La expresión de ARN de *KAL1* también fue comprobada por *Western Blot*. (E) Los niveles de expresión relativa de *KAL1* entre ratones transgénicos se midieron a P0 y P30, siendo más elevados en los animales homocigotos. Se representa *t*-test de Student ***: $p < 0,001$.

Los ratones transgénicos son viables, fértiles y transmiten el transgén a su descendencia. La inserción de EGFP y *KAL1* se confirmó al genotipar por PCR usando como muestra el ADN genómico de las colas de los ratones (Figura 25B). Para valorar la expresión del ARNm de la secuencia *KAL1* en ratones transgénicos, se realizaron PCR

semicuantitativas en tiempo real usando ADNc amplificado a partir de ARNm obtenido de cerebro con una sonda Taqman específica para el gen *KAL1* humano (**Figura 25C**). Los resultados confirmaron que los ratones transgénicos expresaron el ADNc de *KAL1*, mientras que los ratones salvajes no. La expresión de la proteína GFP fue valorada mediante Western blot y fue consistente con la de *KAL1* (**Figura 25D**). Después de cuatro generaciones de retrocruzamiento con ratones salvajes C57BL/6, se vio que la expresión del transgén era estable y se usó una línea, con un nivel alto de expresión de ARNm de *KAL1* en comparación con las demás, para continuar con los retrocruzamientos y generar una línea transgénica de homocigotos. De este modo, se observó una mayor sobreexpresión del transgén en ratones homocigotos (A1/A1) en comparación con los heterocigotos (+/A1) durante el desarrollo postnatal y en jóvenes adultos tanto para GFP como para *KAL1* (P0-P30, **Figura 25E**).

VII. La sobreexpresión de anosmina-1 afecta a la función olfativa

En el primer experimento de comportamiento llevados a cabo como se ilustra en la **Figura 26A**, los ratones de los grupos control (+/+) y heterocigotos (+/A1) mostraron una disminución significativa en el tiempo de investigación entre la primera y las siguientes presentaciones de linalool, indicando que estos animales se habituaron a la presencia de dicho odorante (**Figura 26B**). Sin embargo, los datos de los animales homocigotos (A1/A1) reflejan una curva más plana sin diferencias significativas entre cada exposición. Curiosamente, los ratones A1/A1 pasaron menos tiempo investigando en la primera exposición al odorante, sugiriendo una diferencia en su capacidad de percepción (**Figura 26B**). En el siguiente paradigma, los ratones fueron sometidos a una sesión de habituación/deshabituación en la que fueron expuestos a tres odorantes distintos. En este experimento, tras cuatro exposiciones consecutivas a carvona+, se les presentó su enantiómero (carvona-), un odorante muy similar. A continuación, el odorante al que habían sido habituados previamente fue presentado de nuevo en dos ocasiones antes de la exposición a un tercer tipo de odorante totalmente distinto (cineol; **Figura 26C**). De modo similar al primer experimento, sólo se observaron diferencias en el caso de los ratones A1/A1 en la primera exposición a carvona+ (**Figura 26C**). No se apreciaron diferencias en el tiempo de investigación de cada odorante entre grupos para el resto de las exposiciones. Adicionalmente, en un experimento paralelo con otro grupo de odorantes (octanal, heptanal y anisol en este caso), encontramos que la curva de habituación/deshabituación fue muy similar para los tres grupos (**Figura 26D**). Cada odorante puede evocar diversas respuestas dentro de un mismo paradigma experimental y esto podría deberse a una activación selectiva de grupos de glomérulos por la naturaleza específica de cada odorante (Wachowiak y Shipley, 2006).

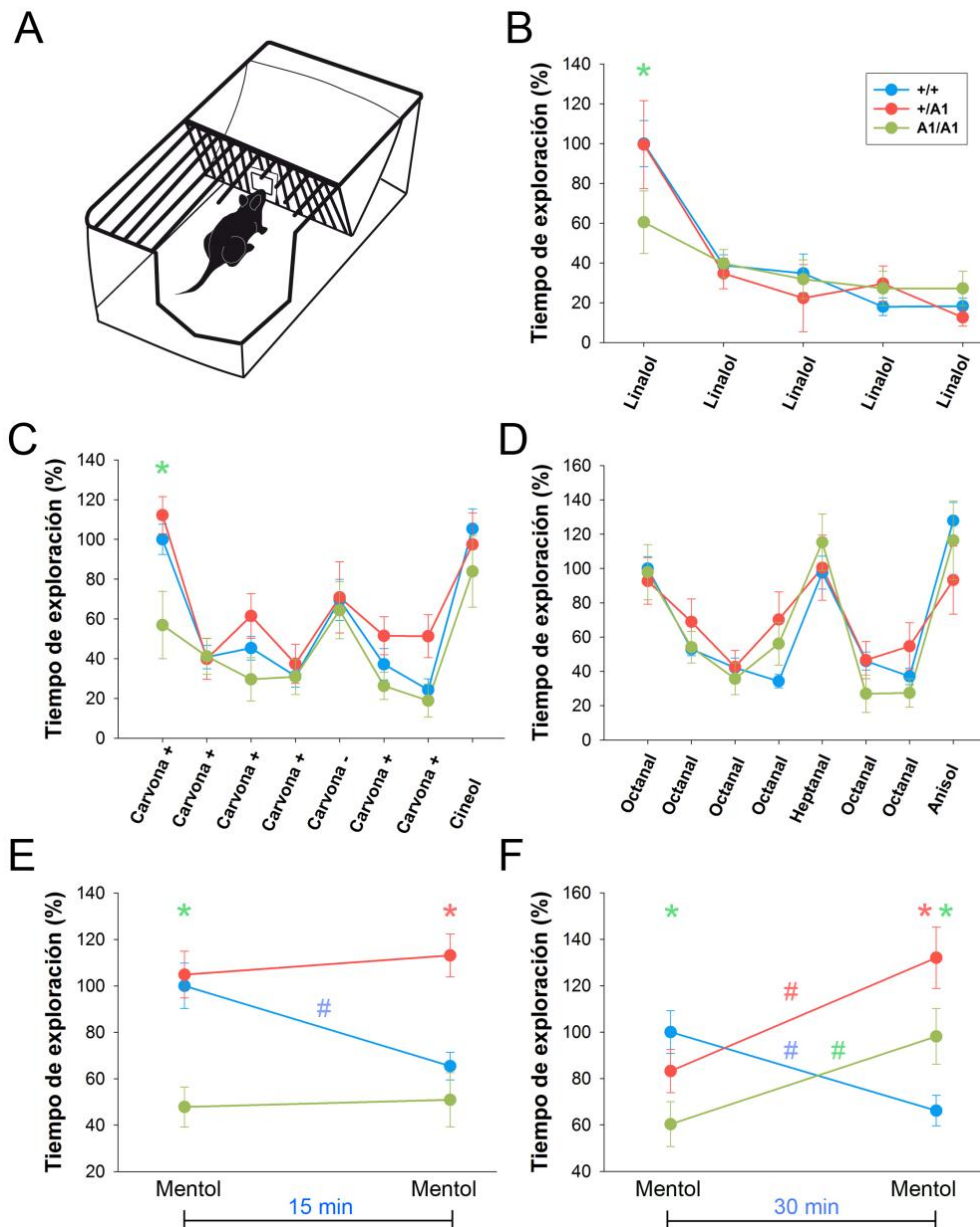


Figura 26. Los ratones transgénicos de sobreexpresión de anosmina-1 muestran defectos en la percepción olfativa y en la memoria olfativa a corto plazo. (A) Esquema representativo del procedimiento usado para llevar a cabo los experimentos de comportamiento olfativo con ratones control (+/+), heterocigotos (+/A1) y homocigotos (A1/A1). **(B)** Los ratones A1/A1 exploraron el odorante linalool durante menos tiempo que los ratones control, presentando una curva de habituación más plana. **(C)** De nuevo, los ratones A1/A1 emplearon menos tiempo en olisquear activamente la bandeja con el nuevo odorante: carvona+. Sin embargo, no mostraron diferencias en la discriminación de su enantiómero, la carvona- y de un odorante nuevo completamente distinto: el cineol. **(D)** En el caso del octanal-heptanal-anisol, no se apreciaron diferencias entre los distintos grupos de animales. Todas las exposiciones de **(B)** a **(D)** duraron 90 segundos y entre cada una hubo un tiempo de reposo de 2 minutos. Se analizó la memoria olfativa a corto plazo con dos presentaciones de mentol durante 5 minutos con 15 **(E)** ó 30 **(F)** minutos de descanso entre medias. En todas las cuantificaciones se tomó el tiempo inicial del grupo +/+ como referencia del 100% y los demás tiempos fueron relativizados con respecto a ellos. Los resultados de los ANOVA se representan: *: $p < 0,05$ para diferencias respecto a los animales silvestres. Los resultados de los t-test de muestras pareadas se representan: #: $p < 0,01$.

En el siguiente experimento se evaluó la memoria olfativa a corto plazo mediante la exposición de estos ratones una vez a mentol (sin una habituación previa) y, tras un periodo de descanso de 15 minutos, una segunda exposición al mismo odorante (**Figura 26E**). Sólo los ratones control pasaron menos tiempo en la segunda exposición, lo cual sugiere que en la segunda exposición recordaron la primera vez y en consecuencia, mostraron menos interés. Sin embargo, ambos grupos de transgénicos (+/A1 y A1/A1) mostraron un comportamiento anormal y en la segunda exposición pasaron una cantidad de tiempo similar a la primera vez. Además, de acuerdo con los experimentos ilustrados en las **figuras 26B y 26C**, los ratones A1/A1 exploraron menos tiempo que los otros grupos en la primera exposición (**Figura 26E**), lo que podría explicarse como un problema de percepción. Cuando se dobló el tiempo de descanso entre las dos presentaciones de mentol con animales distintos (30 minutos), los ratones silvestres mostraron una respuesta muy similar al experimento anterior, con una reducción de un 40% en el tiempo de exploración (**Figura 26E-F**). Curiosamente, tras los 30 minutos ambos grupos de transgénicos (+/A1 y A1/A1) estuvieron más tiempo explorando que en la primera exposición, lo cual apuntaría a una afectación de la memoria olfativa, aunque únicamente los animales A1/A1 presentaron problemas de percepción olfativa (**Figura 26F**). En conclusión, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de anosmina-1 altera la percepción olfativa y la memoria olfativa a corto plazo.

VIII. La sobreexpresión de anosmina-1 causa alteraciones en la densidad de interneuronas en el BO

Entonces, en un intento de encontrar evidencias morfológicas que pudieran explicar estas alteraciones en el comportamiento olfativo, se caracterizó el sistema olfativo de estos ratones. Se estudió el epitelio olfativo y no encontramos diferencias macroscópicas aparentes en los ratones transgénicos en comparación con los silvestres (datos no mostrados). Se estimó el volumen del BO mediante el método de Cavalieri y no se observaron diferencias ni en el volumen total ni en cada una de las capas que lo componen, aunque se apreció una ligera alteración en la forma global del BO en ambos grupos de ratones transgénicos (**Figura 27A-B**). También se cuantificó el número total de glomérulos en el BO, así como su distribución rostro-caudal por sección y en ningún caso se hallaron diferencias significativas entre los animales transgénicos y los silvestres (**Figura 27C-D**).

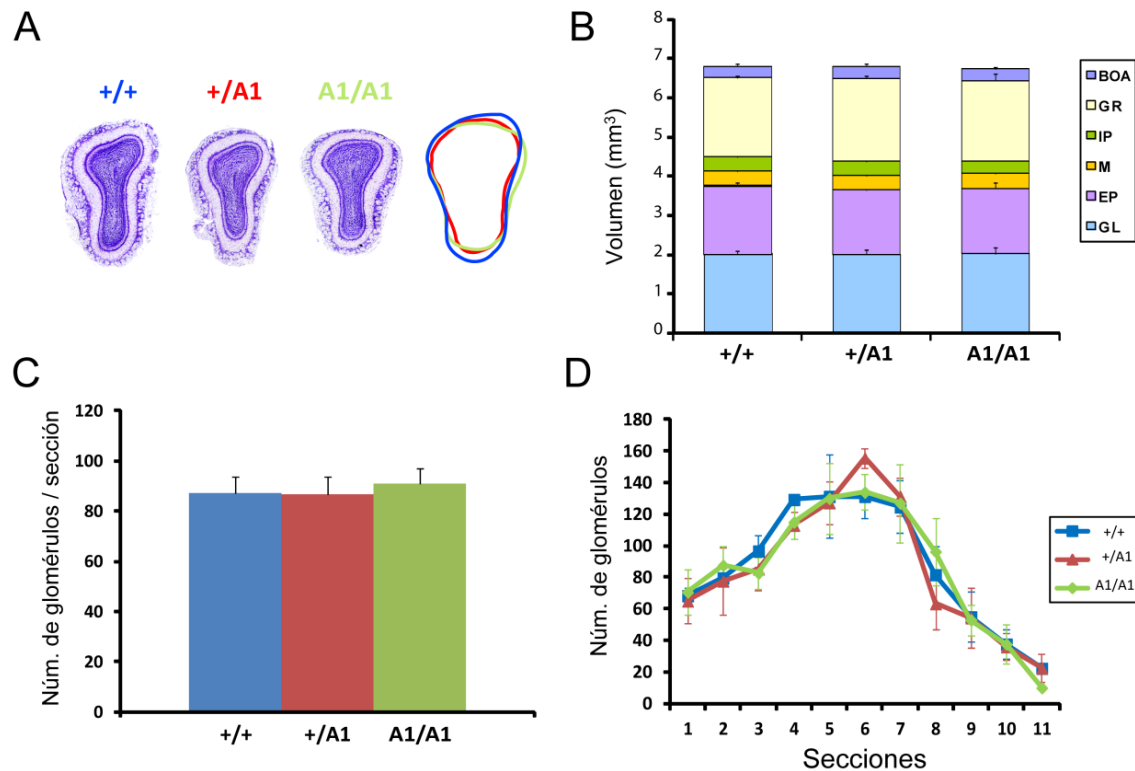


Figura 27. Análisis morfológico comparativo del BO. (A) Ejemplo de los BO de los tres grupos de ratones donde se apreciaron ligeras diferencias en la forma. (B) Gráfica de las estimaciones del volumen global del BO y de cada capa que lo componen. (C-D) Gráficos que muestran el similar número medio de glomérulos por sección y su distribución rostro-caudal en cada una de las secciones.

Puesto que no se encontraron grandes diferencias anatómicas entre los distintos grupos de ratones, se continuó con un análisis más detallado consistente en la estimación de la densidad de distintas poblaciones neuronales en el BO (neuronas NeuN⁺, CR⁺, CB⁺, TH⁺ y PV⁺). El análisis estereológico reveló un incremento significativo en la densidad de tres poblaciones de interneuronas en los ratones A1/A1, localizadas principalmente en tres capas distintas (**Tabla 2**). Se observaron más interneuronas maduras NeuN⁺ en la capa granular, donde la inmensa mayoría son GABAérgicas (**Tabla 2**). Adicionalmente, más interneuronas GABAérgicas (PV⁺) fueron encontradas en la capa plexiforme externa (**Tabla 2**). En cambio, sólo en el caso de las interneuronas dopaminérgicas TH⁺ (también GABAérgicas), situadas principalmente en la capa glomerular, se hallaron diferencias del doble de células no sólo en ratones A1/A1, sino también en +/A1 en comparación con los animales +/+ (**Tabla 2; Figura 28A**). Por el contrario, ni el número de interneuronas CR⁺ ni CB⁺ variaron significativamente en ratones transgénicos en comparación con los silvestres (**Tabla 2**).

(10 ⁴ céls/mm ³)	NeuN ⁺ (n=6 ratones/grupo)			Calretinina ⁺ (n=5)		
Capas	+/+	+/A1	A1/A1	+/+	+/A1	A1/A1
GL	21,2 ± 2,5	22,6 ± 1,9	21,2 ± 2,5	12,4 ± 1,6	10,9 ± 1,1	10,5 ± 1,2
PE	7,7 ± 0,8	7,9 ± 1,1	6,7 ± 0,9	3,5 ± 0,3	2,8 ± 0,3	4,3 ± 0,4
GR	40,3 ± 5,2	35,7 ± 1,7	55 ± 5,5 *	9,5 ± 0,7	7,9 ± 0,6	10,5 ± 1

(10 ⁴ céls/mm ³)	Calbindina ⁺ (n=5)			Tirosina Hidroxilasa ⁺ (n=4)			Parvalbúmina ⁺ (n=3)		
Capas	+/+	+/A1	A1/A1	+/+	+/A1	A1/A1	+/+	+/A1	A1/A1
GL	6.3 ± 0.9	7.4 ± 0.7	7.5 ± 0.9	13.6 ± 2.1	26.3 ± 2.3 *	25.6 ± 2.8 *	--	--	--
PE	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.3	3.2 ± 0.4	--	--	--	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.3	8.5 ± 0.3 *

Tabla 2. Cuantificaciones estereológicas de la densidad de distintas poblaciones de interneuronas del BO atendiendo a su distribución zonal por capas. Abreviaturas: GL, glomerular; PE, plexiforme externa; GR, granular. Los resultados de los ANOVA se representan: *: p<0,05 para diferencias respecto a los animales silvestres.

Se confirmó el incremento de células TH⁺ en ratones transgénicos mediante la cuantificación relativa de la expresión de ARNm de TH por qRT-PCR, observando resultados consistentes con los recuentos de células (**Figura 28A-B**). Además, se evaluaron los niveles de ERK/pERK dentro del BO, implicados en la ruta de señalización por activación de receptores tirosín-quinasa de producción de la encima TH, y se encontró un incremento significativo de la forma activada pERK en ambos grupos de ratones transgénicos (**Figura 28A-B**). Por otro lado, puesto que se ha descrito una fuerte expresión de anosmina-1 en las células mitrales y su función como guía del crecimiento de sus axones a corteza (Clemente et al., 2008; Soussi-Yanicostas et al., 2002), se cuantificó el número de neuronas de proyección (neuronas mitrales) y no se encontraron diferencias (datos no mostrados), lo cual descartaría un posible mecanismo de compensación para el incremento de interneuronas GABAérgicas.

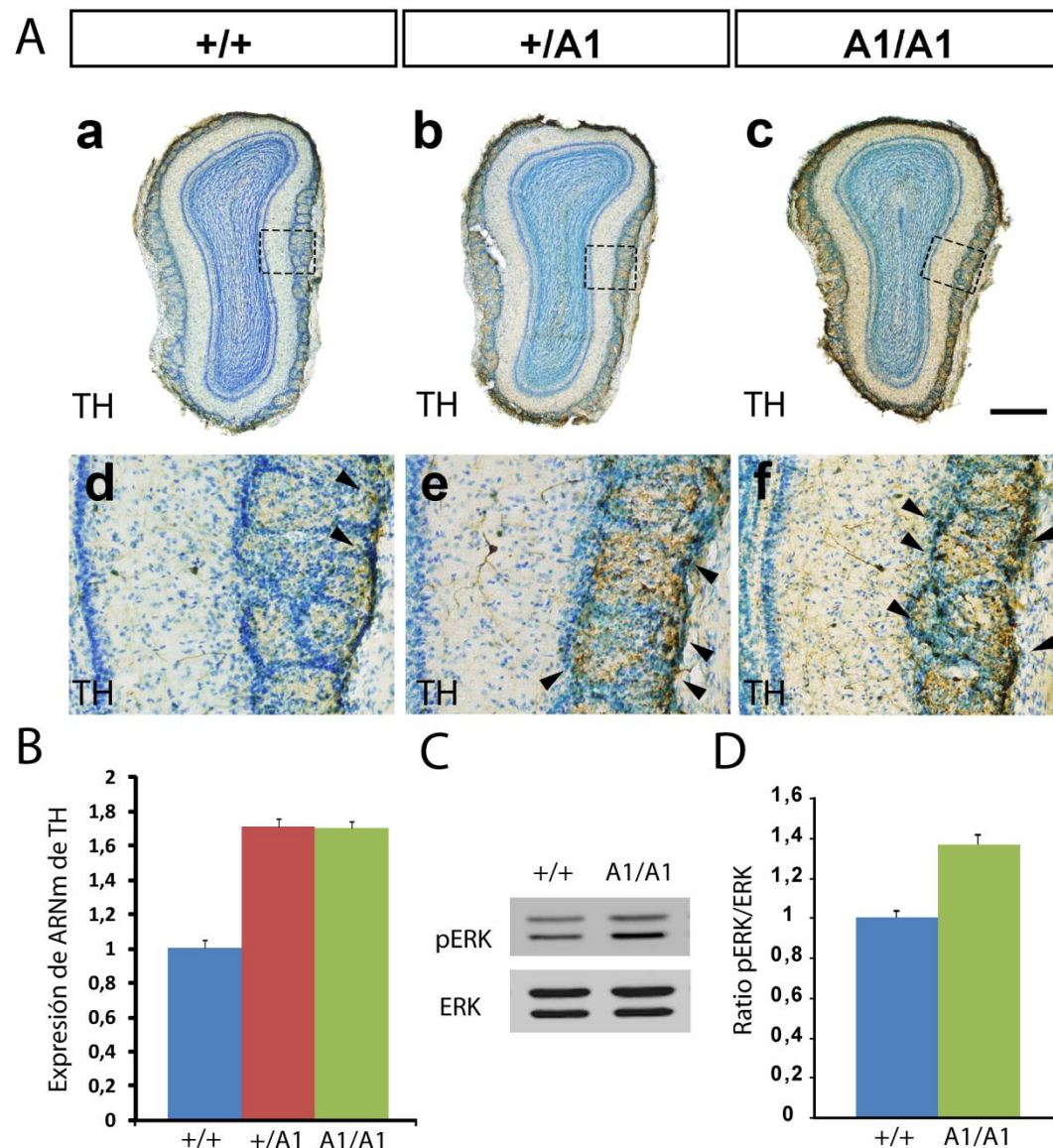


Figura 28. Estudio de la expresión de distintas proteínas y ARNm en el BO de ratones adultos (P80). (A) Ejemplos ilustrativos de la expresión de células TH⁺ en el BO de los tres grupos (silvestres, heterocigotos y homocigotos). (B) Análisis de la expresión del ARNm de TH por qRT-PCR. (C) Ejemplo del análisis de la expresión de proteínas pERK/ERK por *Western blot*. (D) Cuantificación de la expresión relativa pERK/ERK por grupo. Barra de escala: 500 μ m en (Aa-Ac) y 100 μ m en (Ad-Af).

IX. La sobreexpresión de anosmina-1 no cambia el tracto olfativo lateral (TOL)

Por otro lado, puesto que anosmina-1 controla el crecimiento axonal de las neuronas de proyección del BO, desempeñando un papel importante en el control de la guía de axones y la formación de colaterales axónicas durante el desarrollo (Soussi-Yanicostas et al., 2002), se realizaron inyecciones de trazador en el BO para analizar esta estructura y ver si las alteraciones en el TOL podrían explicar la disfunción olfativa observada en ratones A1/A1. A lo largo de toda la estructura no se apreciaron cambios significativos ni en los axones primarios ni en sus colaterales en los tres grupos de

animales estudiados (**Figura 29**). Estos datos parecen coincidir con la falta de diferencias en las células mitras (ver más arriba).

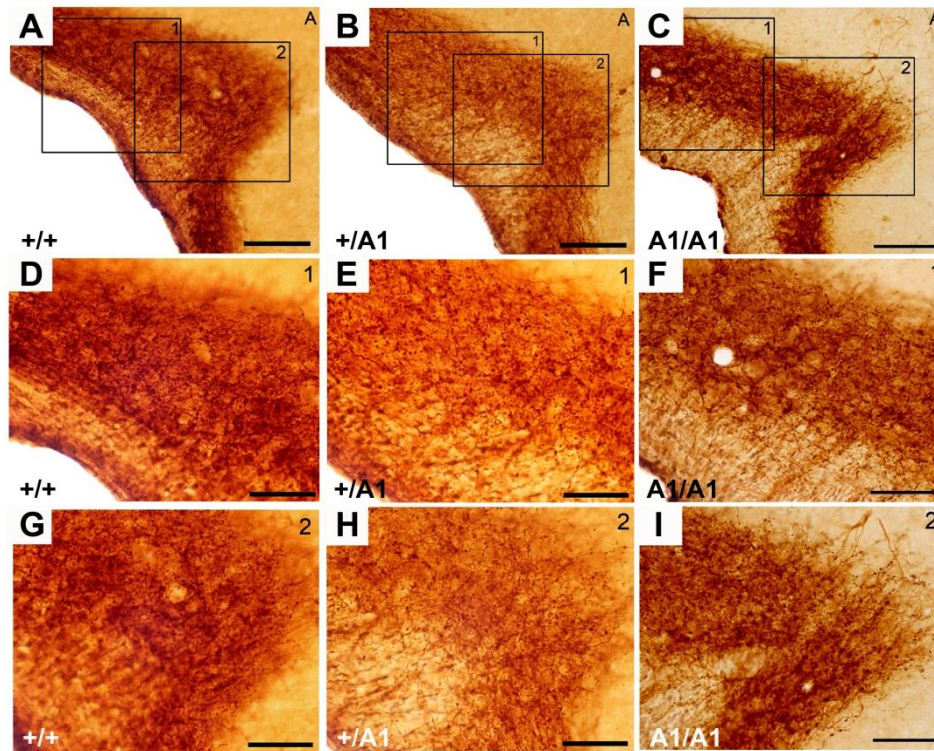


Figura 29. Estudio del tracto olfativo lateral por inyección del trazador BDA 10000 en ratones adultos (P80) silvestres, heterocigotos y homocigotos. Barra de escala: 100 μm en A-C y 50 μm en D-I.

X. La sobreexpresión de anosmina-1 produce cambios morfológicos en la SVZ

Debido a que se encontró que los ratones homocigotos presentaban una mayor densidad de interneuronas en el BO *in vivo*, a continuación se pasó a estudiar el nicho germinativo que produce estas células en el adulto: la SVZ (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Luskin, 1993). Después de un exhaustivo análisis comparativo inmunohistológico de la SVZ, no se observaron diferencias significativas entre los animales heterocigotos y silvestres (datos no mostrados). Por lo tanto, por motivos de concisión, sólo se tomarán en consideración los ratones silvestres y los homocigotos.

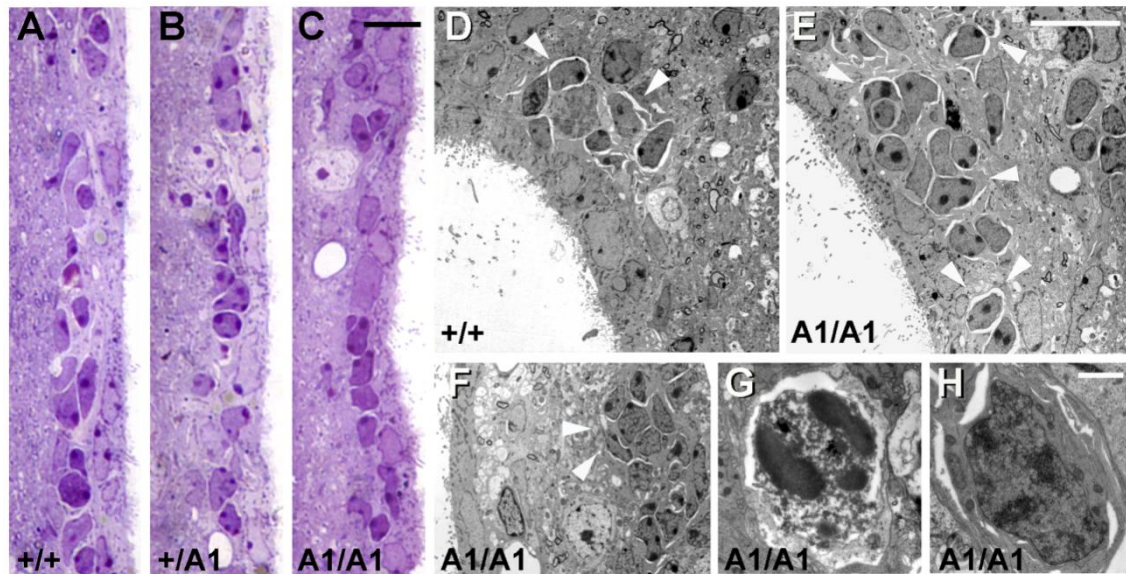


Figura 30. Estudio morfológico del nicho neurogénico de la SVZ en ratones adultos (P80) silvestres, heterocigotos y homocigotos. (A-C) Tinción con azul de toluidina en cortes semifinos donde puede apreciarse un mayor grado de desorganización en la SVZ con numerosas protuberancias e irregularidades en su superficie en los ratones A1/A1. (D-E) Imágenes de microscopía electrónica ilustrativas de la mayor cantidad de neuroblastos (ver cabezas de flechas) y de espacios intercelulares en animales A1/A1. (F) Detalle de un grupo de células migradoras a mayor distancia del ventrículo (ver cabezas de flechas blancas). (G-H) Detalles de células picnóticas y en mitosis, también encontradas con mayor frecuencia en animales A1/A1. Barra de escala: 10 μ m en A-C, F, 7 μ m en D-E, y 1 μ m en G-H.

Se realizaron marcajes previos a su inclusión en combinación con la microscopía electrónica con el fin de estudiar la composición celular del nicho neurogénico (**Figura 30A-C**). Las paredes laterales del ventrículo de los ratones A1/A1 presentaron una superficie irregular con numerosas protuberancias, correspondientes a engrosamientos producidos por grupos de células en proliferación bajo su superficie (**Figura 30C**). En los ratones A1/A1 se observaron mayores grupos de células altamente compactas, compuestos por células A y C, especialmente en las zonas dorsal y ventral de la SVZ (**Figura 30D-E**). En homocigotos, estas agrupaciones presentaron un mayor número de espacios intercelulares que en los silvestres, lo cual sugiere una mayor actividad proliferante o migratoria (**Figura 30D-E**). También se apreciaron grupos de neuronas jóvenes aisladas a gran distancia del ventrículo en los A1/A1 (**Figura 30F**), donde se encontró con mayor frecuencia células picnóticas y mitóticas en estos mismos animales (**Figura 30G-H**).

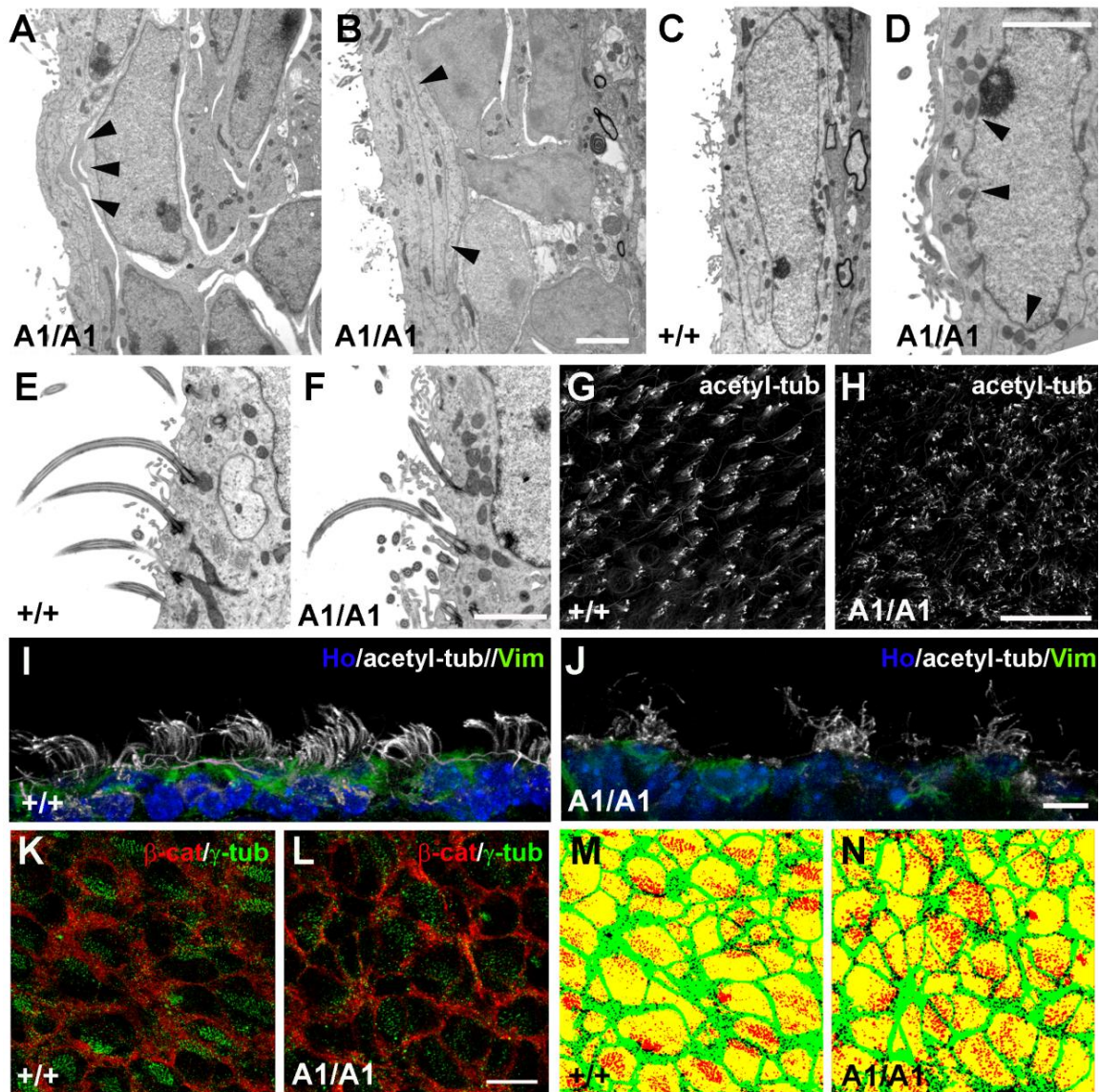


Figura 31. Estudio morfológico de las células endimarias y sus cilios en la SVZ en ratones adultos (P80) silvestres y homocigotos. (A-B) Imágenes de microscopía electrónica (ME) que muestran que las células migradoras se encontraban en contacto directo con las endimarias debido a la intensa expansión de su población en ratones A1/A1, hecho que produjo la extensión de largos procesos entre ellas o interdigitaciones. (C-D) Imágenes de ME ilustrativas de la forma irregular y rugosa de la membrana nuclear de las células endimarias en ratones A1/A1. (E-F) Detalle de ME de la disposición alterada de los cilios de las células endimarias en ratones A1/A1. (G-H) Imágenes microscopía confocal de preparaciones *whole-mount* de SVZ que muestran una visión global de la desorganización de los cilios de las células endimarias en ratones A1/A1. (I-J) Imágenes de microscopía confocal de los cilios de las células endimarias en cortes transversales. (K-L) Imágenes de microscopía confocal de la disposición de los cuerpos basales (γ -tubulina⁺) de los cilios en la superficie de las membranas de células endimarias (β -catenina⁺). (M-N) Esquema que representa la organización de los cuerpos basales (puntos rojos) sobre las membranas de las células (líneas verdes). Barra de escala: 2 μ m en (A-F), 50 μ m en (G-H) y 10 μ m en (I-N).

En ocasiones, se encontraron neuronas migrantes en contacto directo con las células endodimales, reduciendo el grosor de esta capa como consecuencia de la expansión de las poblaciones de células A y C (**Figura 31A**). Además, el análisis de la ultraestructura de las células endodimales reveló profundas interdigitaciones de la membrana celular con largas extensiones laterales, así como una forma irregular de la membrana nuclear con la presencia de mitocondrias de mayor tamaño (**Figura 31C-D**). Un detalle muy interesante es que esta morfología anormal de las células endodimales también se reflejó en sus cilios desorientados (**Figura 31E-F**). Con el fin de obtener una perspectiva general frontal a la superficie del ventrículo, se realizaron disecciones globales de la estructura de la SVZ como ya ha sido descrito con anterioridad (Mirzadeh et al., 2008). La superficie apical de las células B normalmente se encuentra rodeada por las células endodimales siguiendo un patrón específico, de modo similar a que ha sido denominado como *pinwheel disposition* o conformación en molinillo (Mirzadeh et al., 2008; Mirzadeh et al., 2010b). Estas células endodimales presentan una polaridad planar que regula la dirección del batir de los cilios motores para impulsar el LCR y generar su flujo (Sawamoto et al., 2006). El marcaje de tubulina acetilada reveló unos cilios irregulares y desorganizados en ratones A1/A1 en comparación con las células endodimales en los animales control (**Figura 31G-J**), como también se confirmó en cortes transversales a la superficie de la SVZ (**Figura 31I-J**). De modo similar, la combinación de los marcadores γ -tubulina y β -catenina mostró una distinta disposición de los cuerpos basales, los cuales ocupaban una mayor superficie en la membrana celular de las células endodimales en ratones A1/A1 (**Figura 31K-N**).

XI. Las células B, su cilio primario y las células endodimales expresan FGFR1 en la SVZ

Diversos estudios han analizado el origen embrionario de las células endodimales en la SVZ y su estructura y función en el nicho, organizando la dirección del flujo del LCR e, indirectamente, la orientación de la migración de los neuroblastos hacia el BO (Mirzadeh et al., 2008; Mirzadeh et al., 2010b; Sawamoto et al., 2006; Spassky et al., 2005). También se ha propuesto el papel del cilio primario de las células progenitoras como quimiorreceptor de factores de crecimiento presentes en el LCR (Han et al., 2009; Spassky et al., 2005). Dado que FGFR1 se encuentra presente en las células progenitoras neurales de la SVZ (Frinchi et al., 2008; Gritti et al., 1999; Jackson et al., 2006; Mudo et al., 2007) y que podría ser uno de los efectores principales para la anosmina-1 sobreexpresada, estudiamos cuidadosamente su presencia en la SVZ *in vivo*, y vimos que lo expresaban las células B y, más concretamente, también en la base del cilio primario (**Figura 32A-D y E-H**), lo cual parece sugerir un potencial rol en esta estructura. Análogamente, FGFR1 se encuentra globalmente expresado en las células endodimales ($vimentina^+/nestina^+$) que lindan con el ventrículo y que, al igual que las células B, descienden de la glía radial (**Figura 32I-L**).

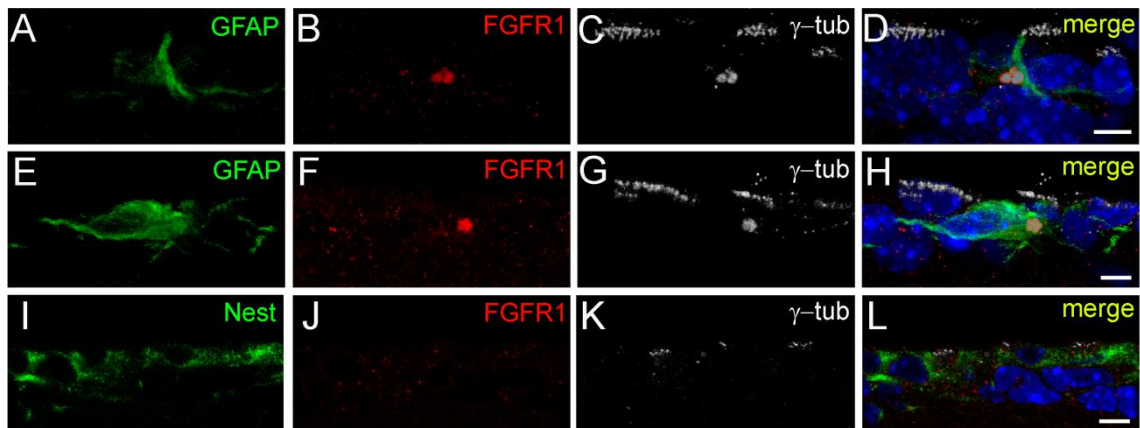


Figura 32: Análisis de la expresión de FGFR1 en la SVZ de ratones adultos (P80). (A-L) A lo largo de toda la SVZ se observó un marcaje punteado de FGFR1, especialmente intenso en las células endoteliales (Nestin⁺/Vimentina⁺) y en los astrocitos en general (GFAP⁺). (A-H) Las células B1 (GFAP⁺) presentan cilio primario (puntos gruesos de γ -tubulina) donde, además, muestran una fuerte expresión de este receptor en el cuerpo basal del cilio. Barra de escala: 2 μ m en (A-H) y 5 μ m en (I-L).

XII. La sobreexpresión de Anosmina-1 estimula la neurogénesis en la SVZ *in vivo*

La cuantificación de las células proliferantes de la SVZ en el adulto (P80) evidenció un significativo incremento del doble en el número global de células PH3⁺, marcador de la fase M del ciclo celular, en ratones A1/A1 en comparación con los ratones +/+ (Figura 33A-C). El siguiente paso fue analizar la proliferación de las células migrantes, que todavía retienen una cierta actividad proliferante, y se confirmó este extremo mediante un doble marcaje de las células PH3⁺ con el anticuerpo DCX. En efecto, encontramos una mayor tasa significativa de proliferación en animales homocigotos que en los silvestres (Figura 33A-C). En alguna ocasión, esta elevada proliferación dio lugar a la formación de hiperplasias polipoides, que llegaron a romper la pared de la SVZ e invadir el lumen del ventrículo (Figura 33D-F).

En animales de dos meses de edad (P60) se inyectó BrdU y, tras un periodo de 20 días, se cuantificó la presencia de células que habían incorporado BrdU en los BOs. Como era de esperar, se obtuvo un incremento significativo de células BrdU⁺ en ratones A1/A1 en comparación con los +/+ (Figura 33G-I). Sin embargo, cuando se analizó la densidad relativa de células apoptóticas en el BO con un marcaje con el anticuerpo caspasa-3 activada, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (datos no mostrados), lo que sugiere que la sobreexpresión de anosmina-1 no afectó a la muerte celular. En conjunto, estos datos explican que la mayor densidad de interneuronas maduras en el BO observada en ratones A1/A1 (Tabla 2) fue causada por un fuerte incremento en la proliferación en su nicho de origen, la SVZ del cerebro anterior.

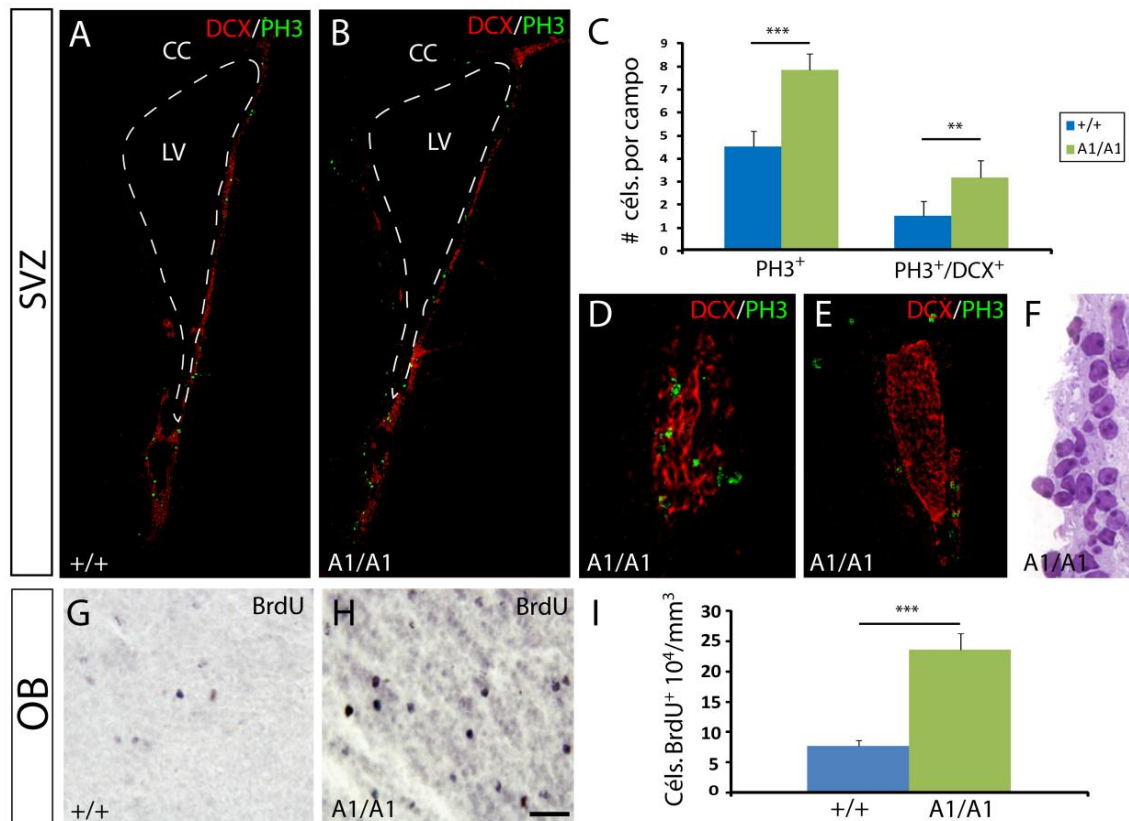


Figura 33. Estudio de la proliferación en ratones adultos (P80) silvestres y homocigotos. (A-B) Imágenes ilustrativas de la proliferación en la SVZ de ratones +/+ y A1/A1. **(C)** Tanto el número de células PH3⁺ y PH3⁺/DCX⁺ fue mayor en ratones A1/A1. **(D-F)** Ejemplos de las hiperplasias encontradas en ratones A1/A1. En algunos casos, llegaron a romper la pared de células endimarias y salir al lumen del ventrículo. **(G-I)** La densidad de células BrdU⁺ en el BO fue significativamente mayor en animales A1/A1. Barra de escala: 100 μ m en **(A-B)**; 20 μ m en **(D)**; 30 μ m en **(E, G-H)**, 10 μ m en **(F)**.

XIII. La sobreexpresión de anosmina-1 incrementa la migración de neuroblastos *in vitro*

Como datos previos ya descritos han demostrado que esta proteína de la ECM interviene en la migración de neuroblastos de la SVZ durante el desarrollo embrionario y postnatal (**Figuras 21-23**), estudiamos si este incremento de células BrdU⁺ observado en el BO de los ratones A1/A1 era la simple consecuencia de un aumento de proliferación en la SVZ, como ya se ha mostrado, o si también podía deberse a una modificación del comportamiento migratorio de los neuroblastos postmitóticos.

En primer lugar, se evaluó la capacidad adhesiva de los neuroblastos de la SVZ (Tuj1⁺) y vimos que los mayores niveles de anosmina-1 endógena de los animales +/+A1 y A1/A1, respectivamente, se correlacionó gradualmente con un número más alto de células Tuj1⁺ adheridas al fondo de pocillos pretratados con A1, especialmente mayor en el caso de animales homocigotos (**Figura 34A**). Esto sugeriría que las interacciones homofílicas A1-A1 incrementan los niveles de adhesión en estas células, como ya se sabe que ocurre en precursores de oligodendrocitos (Bribián et al., 2008).

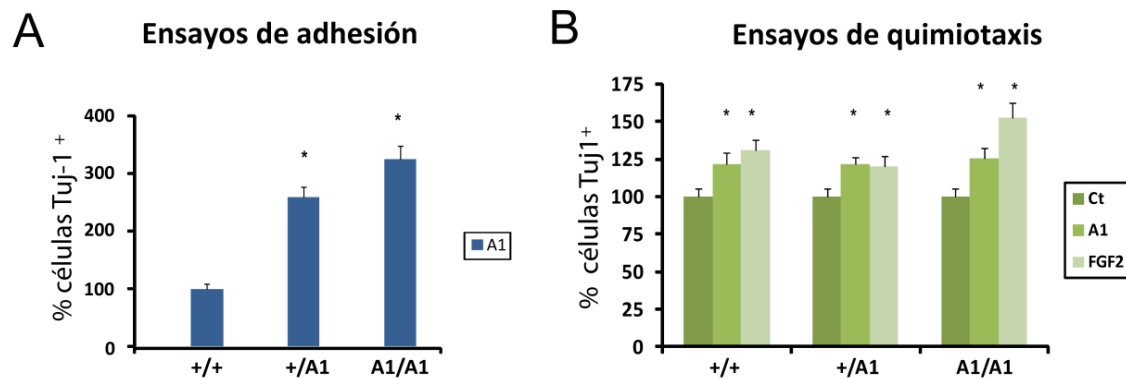


Figura 34. Ensayos *in vitro* con cultivos disociados de SVZ de ratones P0 silvestres, heterocigotos y homocigotos. (A) En ensayos de adhesión (o Terasakis) se vio que la anosmina-1 sobreexpresada induce un incremento de la adhesión de neuroblastos cuando el fondo del pocillo es pretratado con anosmina-1. (B) En ensayos de quimiotaxis en *transwells* o cámaras Boyden se observó que anosmina-1 y FGF2 ejercen un efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de SVZ. Los resultados de los ANOVA se representan *: $p < 0,05$ para diferencias respecto a los animales silvestres.

Además, realizamos ensayos de quimiotaxis en ratones silvestres y observamos que tanto anosmina-1 como FGF2 tenían un efecto quimioatrayente sobre los neuroblastos de la SVZ, corroborando nuestras observaciones anteriores (**Figuras 21-23**). De modo análogo, en ambos grupos de ratones transgénicos (+/A1 y A1/A1) tanto anosmina-1 como FGF2 ejercieron el mismo efecto quimiotrópico (**Figura 34B**).

Para determinar la influencia de la anosmina-1 endógena sobreexpresada por estos animales en la migración de neuroblastos, cultivamos explantes de SVZ en matrices de colágeno sin ninguna molécula suplementaria con el fin de evaluar su motilidad intrínseca. La identidad neuronal de las células migratorias fue comprobada, siendo todas ellas Tuj1⁺/DCX⁺/Olig2⁻/GFAP⁻ (**Figura 35A-I**), y la concurrencia de proliferación en células migratorias como causa de una mayor migración fue descartada mediante doble marcaje con Tuj1 y PH3 (**Figura 35J-M**).

La migración celular en explantes fue analizada calculando el área ocupada por neuroblastos migratorios junto con el índice de migración (IM: área final del explante dividida entre la superficie inicial). Los explantes de SVZ de ratones A1/A1 mostraron un mayor IM (**Figura 37A-D**), así como una superficie ocupada por células A más extensa (**Figura 36A-C, E**), por lo que podemos concluir que la anosmina-1 sobreexpresada incrementa la capacidad migradora en estos animales.

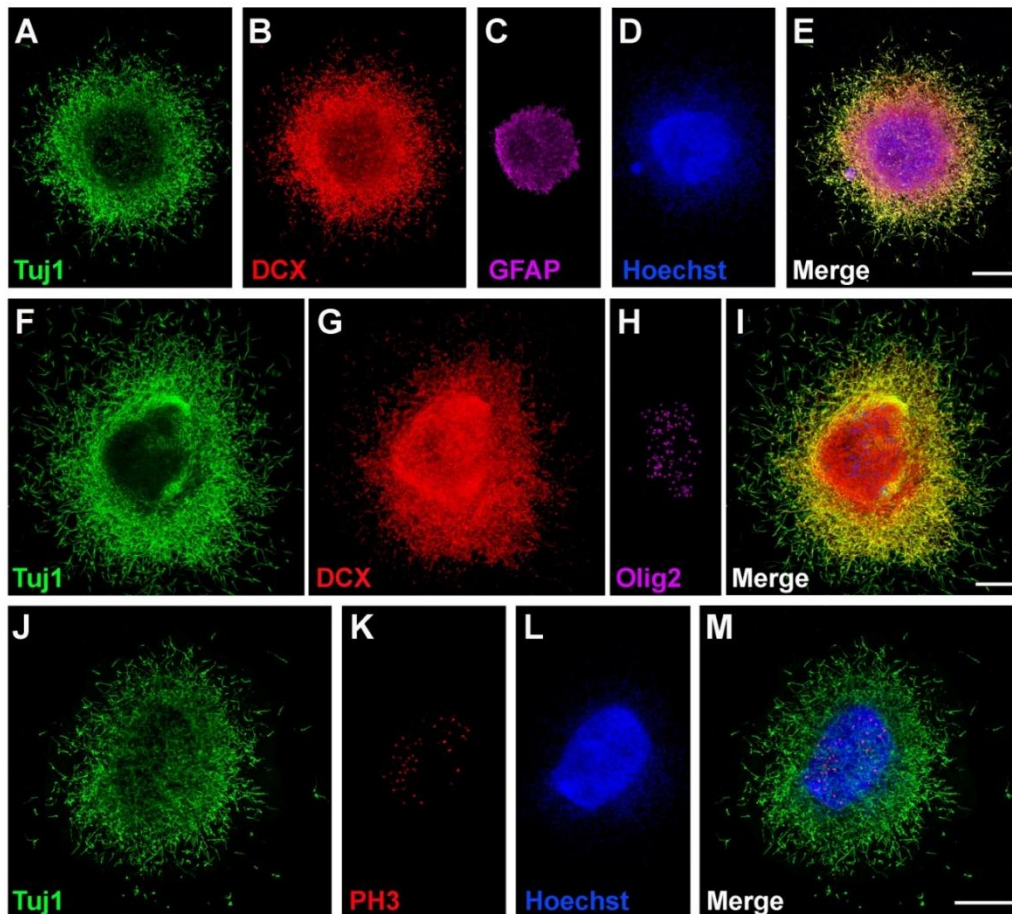


Figura 35. Caracterización de los explantes de SVZ de ratones P0 silvestres, heterocigotos y homocigotos. (A-I) Las células que migraron fuera de los explantes fueron de la estirpe neuronal (DCX+/Tuj1+/GFAP-/Olig2-) y se vio que las células en proliferación no migraron y se quedaron dentro de los explantes (J-M). Barra de escala: 200 μ m en (A-M).

Para explorar los aspectos temporales dinámicos de las diferencias de propiedades migratorias, se analizó el comportamiento de los neuroblastos de la SVZ mediante un estudio de *video time-lapse*, como ya se describió anteriormente (**Figura 21**). Se observó que los movimientos de estas células fueron saltatorios, desplazamientos interrumpidos por periodos estacionarios, y siguieron un patrón de dispersión radial a la hora de abandonar los explantes (**Figura 36F-H**). En esta dispersión, los neuroblastos migraron individualmente por lo general, aunque también se observaron con menor frecuencia, cadenas de células migrando. De acuerdo con nuestras observaciones previas, el seguimiento individualizado de células reveló un incremento en la distancia total recorrida por neuroblastos A1/A1, junto con una mayor velocidad media y un menor número de periodos estacionarios o paradas en comparación con las células procedentes de animales silvestres (**Figura 36I-K**). Por el contrario, no se apreciaron diferencias entre los neuroblastos migrando desde los explantes de animales +/+ y +/-A1 (**Figura 36**). Estos datos indican que la anosmina-1 sobreexpresada incrementa la motilidad intrínseca de las células A en ratones A1/A1, lo cual podría deberse al aumento observado en su adhesión (**Figura 34A**).

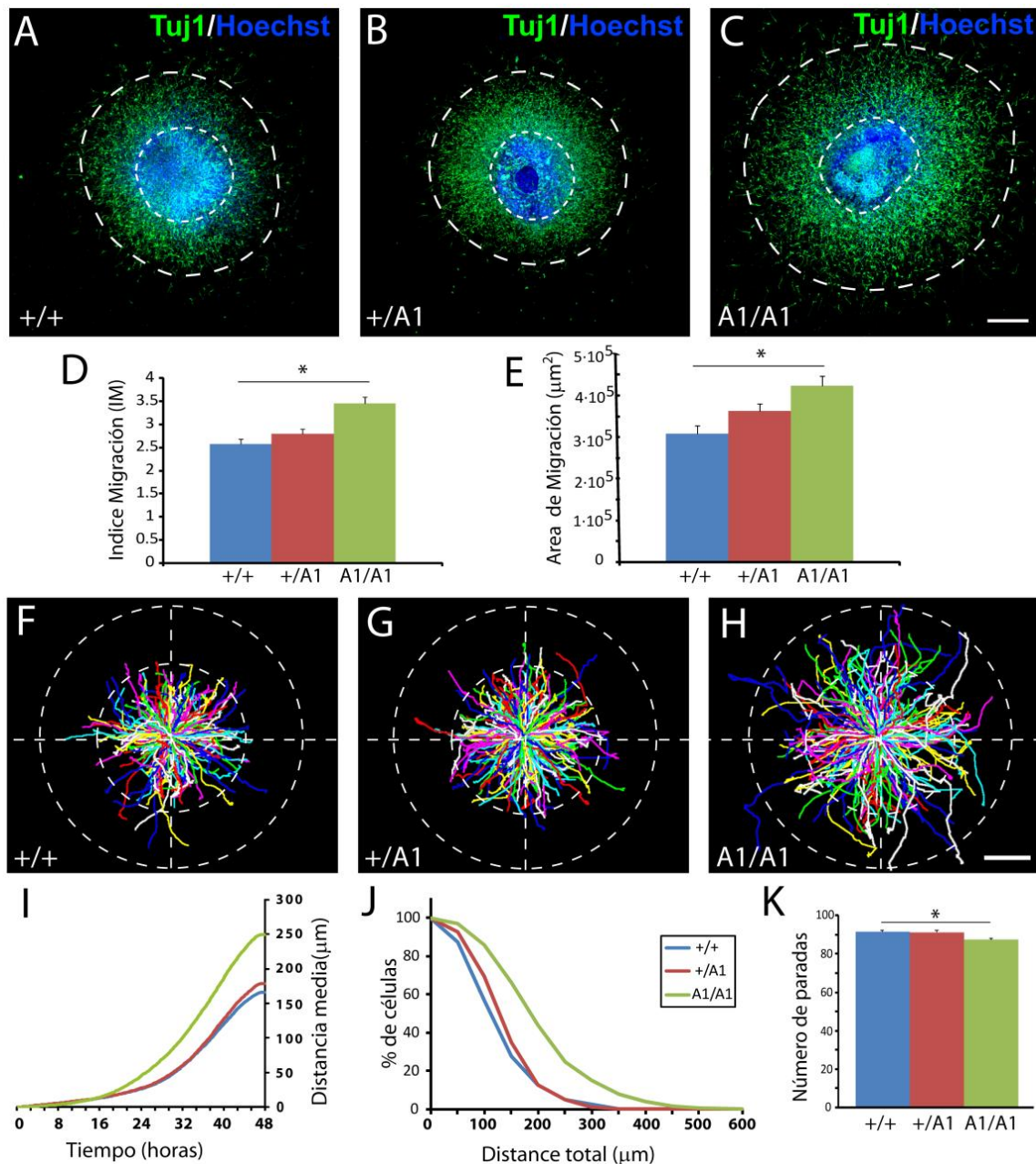


Figura 36. Cultivos de explantes de SVZ de ratones P0 silvestres, heterocigotos y homocigotos. (A-C) Ejemplos ilustrativos de cultivos de explantes de los tres grupos: +/+, +/A1 y A1/A1. Los neuroblastos de los explantes A1/A1 migraron más, como se refleja en su Índice de Migración (IM: área final del explante dividida entre la superficie inicial) (**D**) y en la superficie que ocuparon fuera del explante (**E**). En (**F-K**) se representan los datos del análisis realizado de *video time-lapse*. (**F-H**) Representación de las trayectorias recorridas por los neuroblastos en cada grupo (+/+, +/A1 y A1/A1), referidas a un mismo punto de origen. (**I**) Gráfico de la evolución temporal de la migración media de las células. (**J**) Gráfico acumulativo de la distancia total que recorrieron las células de cada grupo. (**K**) Número medio de paradas o de periodos estacionarios que realizaron los neuroblastos de cada grupo. Los resultados de los ANOVA se representan: *: $p < 0,05$ para diferencias respecto a los animales silvestres. Barra de escala: 200 μm en (**A-C**) y (**F-H**).

DISCUSIÓN

La neurogénesis engloba un complejo conjunto de procesos durante el desarrollo del SNC que, aunque restringidos a algunas zonas concretas del mismo, continúan presentes en el adulto y resultan cruciales para el correcto funcionamiento del sistema. Los efectos biológicos de anosmina-1 y FGF2 han sido analizados sobre todo durante el desarrollo neural y poco se sabe acerca de sus efectos en el SNC adulto. En conjunto, este trabajo aporta nueva información acerca de la actividad de la proteína anosmina-1, junto con FGF2 a través de FGFR1, su receptor más estudiado, en el nicho neurogénico de la SVZ durante el desarrollo y también en el adulto.

Anosmina-1, proteína de ECM, interviene en un amplio rango de procesos en el SNC

Diversos trabajos previos han estudiado en detalle la expresión de anosmina-1 en el sistema olfativo de roedores durante el desarrollo, en los que se vio que esta proteína se encuentra presente sobre todo en el BO (Clemente et al., 2008; Soussi-Yanicostas et al., 2002). En concreto, las células de la capa mitral y sus axones, que proyectan a la corteza olfativa formando el TOL, muestran una especial inmunorreactividad, así como las interneuronas de las capas granular y glomerular y los axones del nervio olfativo que inervan los glomérulos del BO. El conjunto de estos datos aportó una primera idea de la importancia del papel que dicha proteína puede desempeñar en la fisiología del sistema olfativo, lo que confirmaba algo supuesto desde la descripción original de la proteína en una de las enfermedades del sistema olfativo mejor estudiadas, el síndrome de Kallmann.

Además, anosmina-1 interviene en distintos procesos biológicos fundamentales más allá del sistema olfativo, tales como la migración celular, la guía axonal y el crecimiento de neuritas (Bribián et al., 2006; Bribián et al., 2008; Bulow et al., 2002; Cariboni et al., 2004; Clemente et al., 2011; Gianola et al., 2009; González-Martínez et al., 2004; Soussi-Yanicostas et al., 2002; Yanicostas et al., 2009). Por su transcendencia mecanística para el campo de la neurobiología del desarrollo, merece la pena destacar un estudio muy reciente que describe que anosmina-1 es secretada por la cresta neural craneal y, mediante un mecanismo de regulación autocrino, promueve la formación de dicha estructura mediante la modulación funcional de FGF8, BMP5 y WNT3a, todos ellos morfógenos bien estudiados (Endo et al., 2012). Estos autores proponen un interesante modelo en el que esta proteína de ECM juega un papel importante controlando la actividad de dichos factores de crecimiento durante el desarrollo embrionario temprano-medio (Endo et al., 2012).

En el cerebro de roedores adultos, la lámina basal de la pared del ventrículo proporciona una amplia fuente de señales que controlan el comportamiento de las células progenitoras neurales, apuntando a la ECM como un regulador emergente de efectos mediados por contacto y señales secretadas (Kokovay et al., 2010; Mercier et al., 2002; Shen et al., 2008; Snapyan et al., 2009; Tavazoie et al., 2008). Curiosamente, en dichas paredes se han descrito microestructuras con altos niveles de

inmunorreactividad de HSPG, llamados fractones, que pueden controlar de modo directo la disponibilidad local de FGF2 (Kerever et al., 2007). Este hecho junto con el reciente descubrimiento de que anosmina-1 regula la actividad de FGF8 durante la formación de la cresta neural (Endo et al., 2012), constituyen dos pistas que invitan a reconsiderar la importancia de las funciones globales de la ECM, subestimadas durante mucho tiempo, como ya se ha indicado en la Introducción, y nos permiten especular acerca del potencial rol de anosmina-1 a la hora de controlar la actividad de otros factores de crecimiento, como FGF2, en nichos neurogénicos no sólo durante el desarrollo, sino también en el SNC adulto.

Anosmina-1 en la neurogénesis de la SVZ

Por un lado, los datos obtenidos en los experimentos de proliferación *in vitro*, nos permitieron llevar a cabo una primera toma de contacto con este proceso biológico y estudiar la actividad de FGFR1 en la SVZ. Aunque el papel de FGF2 como agente mitógeno sobre las células de estirpe astrogial ha sido extensamente documentado, como en la producción y mantenimiento de neuroesferas, en cambio, la implicación de anosmina-1 en procesos relacionados con la neurogénesis no había sido descrita hasta el presente trabajo. Nuestros resultados sobre el papel de anosmina-1 en la proliferación en cultivos de SVZ apuntan hacia un ligero incremento general en el número de células en división, en comparación con la condición control, aunque nunca significativo (**Figura 24**). Lo que en un principio nos pareció una simple tendencia, los posteriores datos obtenidos del análisis del ratón transgénico de sobreexpresión (**Figura 33**) dejan abierta la posibilidad de que, bien con el uso de anosmina-1 a mayor concentración (a partir del extracto concentrado de ECM) o bien a partir de proteína purificada, se pueda obtener un efecto más potente que sobrepase el umbral de significación.

Está aceptado de un modo general que en el SNC el potente mitógeno FGF2 puede ser liberado por las células astrocitarias y que, por distintos mecanismos -difusión, LCR y vasculatura-, alcanza su destino en la población de células progenitoras neurales que expresa FGFRs (Frinchi et al., 2008; Mudo et al., 2007; Zheng et al., 2004). En el presente trabajo mostramos que la presencia de anosmina-1 en la SVZ se encuentra restringida a los neuroblastos y que la expresión global de los receptores de FGFs (principalmente FGFR1 y FGFR2) es elevada, habiendo sido descrito FGFR1 en todas las células de la SVZ (Gritti et al., 1999). En particular, en esta zona se ha descrito que durante el desarrollo embrionario, FGFR1 se halla altamente expresado en las células de glía radial (Zheng et al., 2004) y que en adultos está presente en las células progenitoras neurales, o B1, determinando su destino neuronal y oligodendroglial (Anderson et al., 2007; Furusho et al., 2011; Gálvez-Contreras et al., 2012). Estudios en ratones deficientes en FGFR1 han demostrado una disminución global en la población de glía radial y en los progenitores oligodendrogiales (Seth y Koul, 2008), presentando

estos animales un BO muy reducido debido a severos defectos en la morfogénesis del telencéfalo (Hebert et al., 2003). Además, otros estudios *in vivo*, junto con los realizados en ratones deficientes en FGFR1, han demostrado que la migración desde la SVZ al BO y la morfogénesis inicial del éste son procesos ontogénicos independientes (Bulfone et al., 1998; Hebert et al., 2003; Jankovski et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1999; López-Mascaraque y de Castro, 2002).

Distintas aproximaciones previas, basadas en la infusión de factores de crecimiento (EGF o FGF2) en los ventrículos laterales de animales adultos, han descrito un fenotipo similar, incrementando ambos factores la densidad de células proliferantes en la SVZ, aunque FGF2 en un menor grado que EGF (Doetsch et al., 2002; Kuhn et al., 1997). Curiosamente, 4 semanas después de la infusión de FGF2 estos autores observaron la llegada de un mayor número de neuroblastos al BO, lo cual indica una mayor migración desde la SVZ (Doetsch et al., 2002; Kuhn et al., 1997). Estos estudios sugieren que las distintas respuestas a estos factores de crecimiento se corresponden con diferentes poblaciones celulares en el nicho neurogénico, hecho posteriormente confirmado con inmunomarcajes para EGFR y FGFR (Jackson et al., 2006). Es importante resaltar que, dentro de la SVZ, EGFR se encuentra expresado principalmente en las células de tipo C y en un número limitado de células de tipo B1, y estudios con las poblaciones que expresan EGFR han indicado que la mayor parte de las neuroesferas provienen de la población de células C (Doetsch et al., 2002; Vescovi et al., 1993). Por otro lado, en un modelo de ratón *knock-out* para FGF2 se ha descrito una disminución significativa en la población de células precursoras neurales y, globalmente, en la neurogénesis (Zheng et al., 2004), al igual que se había documentado con anterioridad un menor número de neuronas en el neocórtex (Ortega et al., 1998; Vaccarino et al., 1999). Nuestros datos indican que en el modelo de sobreexpresión de anosmina-1, esta proteína actúa sobre las células progenitoras neurales o B1, que expresan FGFR1, induciendo su proliferación. Este hecho no excluye que pueda estar actuando, también de un modo directo, sobre las demás poblaciones de la SVZ, ya que el citado receptor, expresado prácticamente de modo ubicuo en este sistema, está implicado en multitud de procesos (Gritti et al., 1999; Mason, 2007).

El papel de las células ciliadas en la SVZ

Las células endimarias constituyen una fina capa polarizada con penachos de cilios móviles en contacto con el lumen ventricular SVZ (Del Bigio, 2010). Principalmente, esta capa aporta soporte físico, trófico y metabólico para las células progenitoras dentro de la SVZ (Del Bigio, 2010). Se ha descrito que la orientación de la migración de los neuroblastos desde la SVZ se correlaciona con la dirección del flujo del LCR y que el batir de los cilios de las células endimarias es necesario para el establecimiento de dicho flujo (Sawamoto et al., 2006). En ese mismo trabajo, los autores encontraron que mutaciones en los cilios de las células endimarias en ratones transgénicos

(*Tg737^{orpK}*) producen una migración desorientada hacia otras áreas de la corteza cerebral, aparte del BO, debido a alteraciones drásticas en la longitud, número y organización de dichos cilios, provocando un flujo anómalo del LCR (Sawamoto et al., 2006). En cambio, nuestros resultados en ratones de sobreexpresión de anosmina-1 muestran unas alteraciones más moderadas en los cilios de las células endoteliales que no perturbaron la correcta migración de neuroblastos. Como ya se ha mencionado, la glía radial y su progenie, las células endoteliales, expresan FGFR1 (**Figura 32**; Spassky et al., 2005; Zheng et al., 2004). Así mismo, se ha demostrado que la señalización de FGFR1, inducida por la actividad de FGF8 y/o FGF2, regula la longitud y función del cilio en diversos epitelios durante el desarrollo (Neugebauer et al., 2009). Es más, esta expresión de FGFR1 en las células multiciliadas se ha asociado con la progresión de tumores y varias ciliopatías (Creuzet et al., 2004; Evans et al., 2002; Macatee et al., 2003; Szabo-Rogers et al., 2008; Trumpp et al., 1999; Zaghoul y Brugmann, 2011). Nuestros datos apuntan a un posible papel de FGFR1, inducido por la interacción con anosmina-1, en el batir de los cilios de las células endoteliales en los ventrículos laterales. Esto explicaría las diferencias encontradas entre ratones silvestres y homocigotos, no sólo en la forma de la membrana nuclear, sino también en el número y tamaño de las mitocondrias, posible reflejo de una actividad metabólica local incrementada por las alteraciones en los movimientos ciliares. Numerosos trabajos han descrito también la presencia de FGFR1 en la membrana nuclear celular (para una revisión específica sobre el tema: Stachowiak et al., 2007), con lo que las alteraciones observadas en la membrana nuclear de las células endoteliales en los animales A1/A1 (**Figura 32**) podrían ser consecuencia directa de la excesiva activación de FGFR1 por la sobreexpresión de anosmina-1.

Por otro lado, determinadas células progenitoras neurales en el SNC adulto presentan un cilio primario en contacto directo con la luz de los ventrículos del cerebro (Han et al., 2009; Mirzadeh et al., 2008; Singla y Reiter, 2006). Se ha hipotetizado que este cilio primario actúa como un mecano y quimiorreceptor, sensible a cambios en el flujo del LCR y a moléculas difusibles presentes en este fluido, tales como Shh, Wnt y PDGF, que activarían sus respectivas rutas de señalización (Han et al., 2009; Nusse, 2003). El hecho de que las células progenitoras neurales (o B1) de la SVZ expresan FGFR1, explica el incremento significativo de la proliferación observado en esta zona, así como la ocasional aparición de hiperplasias en el SNC de ratones A1/A1, resultado consistente con los obtenidos mediante la infusión de FGF2, EGF y PDGF en los ventrículos laterales en adultos (Doetsch et al., 2002; Jackson et al., 2006; Kuhn et al., 1997). Así, la interacción FGF2-FGFR1-A1 en las células B1 parece sugerir que este mecanismo de acción podría ser clave en la regulación del comportamiento de las células progenitoras neurales y su especificación funcional definitiva. Es importante recordar que las células B1, además de sus contactos apicales con el LCR, extienden largos procesos basales que establecen contacto directo con los vasos sanguíneos, lo cual supone una fuente constante de señales y nutrientes, como factores de

crecimiento y otras moléculas secretables (**Figura 9**; Mirzadeh et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Teniendo en cuenta todo ello, nuestros resultados ponen de manifiesto la expresión de FGFR1 en las células derivadas de la glía radial: las células endimarias y las progenitoras neurales (B1) de la SVZ. En estas últimas, hemos encontrado expresión de FGFR1 en el cuerpo basal del cilio primario, lo cual nos permite hipotetizar acerca de que este receptor esté implicado, no sólo en la captación de señales presentes en el LCR, sino también en la regulación de la longitud del cilio o en el transporte intraciliar, ambos claves para desencadenar cascadas de señalización intracelular (**Figura 38**).

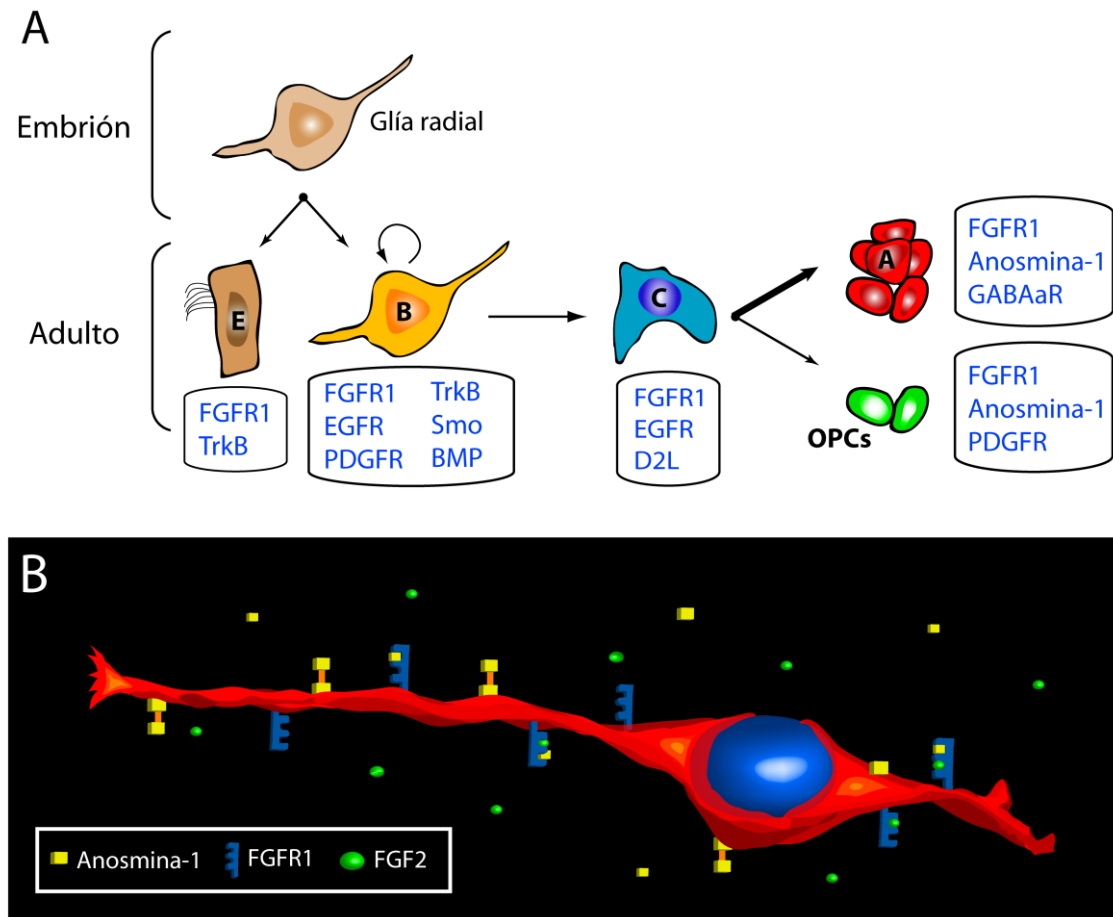


Figura 38. (A) Esquema de las células que componen la SVZ y de algunos de los receptores y moléculas de mayor relevancia para el mantenimiento del nicho, la proliferación y la diferenciación neurogénica y gliogénica. **(B)** Representación de un neuroblasto con morfología bipolar que expresa anosmina-1 y FGFR1.

El complejo anosmina-1-FGF2-FGFR1 interviene en la migración de los neuroblastos de SVZ

En roedores adultos, la neurogénesis continúa presente en el cerebro sano en condiciones normales, en el que nuevas neuronas son generadas en la SVZ y migran tangencialmente por la RMS hasta alcanzar el BO, donde se convierten en interneuronas maduras (Brill et al., 2009; De Marchis et al., 2007; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Nissant et al., 2009).

Así mismo, esta compleja combinación de señales quimioatrayentes y quimiorrepelentes reguladoras de la migración de neuroblastos desde el desarrollo embrionario hasta el adulto, se encuentra lejos de estar completamente comprendida. A pesar de que la bulbectomía no impide la migración de neuroblastos al BO (Jankovski et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1999), estudios *in vitro* han mostrado que distintas moléculas como EGF, netrina-1, prokinetina2 y GDNF son secretadas por el BO y atraen a los neuroblastos que migran desde la SVZ (Caric et al., 2001; Murase y Horwitz, 2002; Ng et al., 2005; Paratcha et al., 2006). Sin embargo, puesto que la eliminación quirúrgica del BO no es suficiente para abolir la migración tangencial desde la SVZ, la atracción a larga distancia parece poco probable que sea la principal responsable del emplazamiento de los neuroblastos al comienzo de la RMS. Junto con el LCR, las proteínas quimiorrepelentes Slit, secretadas en el septo del cerebro anterior y en los plexos coroideos, fuerzan a los neuroblastos a migrar rostralmente y a entrar en la RMS (Hu, 1999; Kaneko et al., 2010; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004; Sawamoto et al., 2006; Wu et al., 1999). También se ha descrito que HGF secretable interviene en la migración de neuroblastos a lo largo de la RMS (Garzotto et al., 2008) y que la pérdida de algunas moléculas expresadas por los neuroblastos, tales como NCAM (Chazal et al., 2000), PSA-NCAM (Cremer et al., 1994; Hu et al., 1996; Ono et al., 1994; Rousselot et al., 1995) o las Eph/ephrinas (Anton et al., 2004; Conover et al., 2000), altera su capacidad de desplazamiento. Otros estudios *in vitro* han mostrado que los astrocitos controlan la migración de estas células mediante la liberación de ciertos factores no identificados en la RMS y el BO, creando así corredores permisivos (Garcia-Marques et al., 2010; Mason et al., 2001). Además, trabajos recientes han descrito que la vasculatura no sólo interviene en la neurogénesis de la SVZ (Calvo et al., 2011), sino que también constituye un andamio para la migración neuronal, tanto durante el desarrollo como en animales adultos (**Figura 10**). En la interacción de los neuroblastos con la vasculatura se sabe que están implicadas moléculas de la ECM para adhesión celular, como lamininas o integrinas (Belvindrah et al., 2007; Hynes, 2009; Shen et al., 2008; Snapyan et al., 2009). Además, se ha visto que los vasos situados dentro de la RMS guían a los neuroblastos en su migración tangencial hasta el BO (**Figura 10**; Snapyan et al., 2009; Whitman et al., 2009), donde estas células cambian su patrón de migración y se dispersan radialmente mediante contactos con fibras de células gliales y vasos sanguíneos en el que intervienen factores neurotróficos, como BDNF, o proteínas de ECM, como reelina y tenascina-R (Bovetti et al., 2007; Hack et al., 2002; Jankovski y Sotelo, 1996; Lois et al., 1996; Peretto et al., 1997; Saghatelian et al., 2004; Snapyan et al., 2009).

En el presente trabajo se aportan datos que demuestran la implicación de FGF2 y anosmina-1 en este proceso migratorio a partir de E14, mucho antes de que la RMS adquiera su conformación madura, y que ambos factores actúan, en gran medida, a través de FGFR1. En primer lugar, mostramos que sendas moléculas secretables se encuentran expresadas siguiendo un patrón espacio-temporal dinámico que coincide

con los picos de migración de los neuroblastos de SVZ (resultados presentes; Pencea y Luskin, 2003; Peretto et al., 2005). Por otro lado, las células migradoras expresan FGFR1 y anosmina-1, hecho que se antoja clave a la hora de controlar su desplazamiento. Además, demostramos el papel dual de FGF2 como agente mitogénico (sobre las células astrogiales) y motogénico (sobre los neuroblastos) durante gran parte del desarrollo, desde E14 a P15, lo cual no resulta sorprendente si se tienen en cuenta sus efectos pleyotrópicos en multitud de sistemas (Mason, 2007; Ornitz, 2000). En concreto, dicho efecto motogénico de FGF2 parece estar mediado únicamente por FGFRs al eliminar por completo su acción mediante dos inhibidores de FGFRs con distinto grado de especificidad: SU5402 y SB402451 (o PD173074). Se ha visto que el primero inhibe específicamente los FGFRs (Mohammadi et al., 1997), mientras que el segundo parece tener un efecto inhibitor adicional sobre otros receptores tirosín-quinasa (Mohammadi et al., 1998). Por el contrario, hemos visto que anosmina-1, añadida exógenamente, no es un agente motogénico para las células migrantes y que actúa, meramente, como una molécula quimioatrayente para los neuroblastos a todas las edades estudiadas, aunque el efecto es más intenso a E17 y P5. En cambio, puesto que sólo la acción del inhibidor SB402451 bloquea completamente la acción de anosmina-1 durante el desarrollo embrionario (E14 y E17), su actividad podría estar mediada por otros receptores alternativos. Sin embargo, en las edades postnatales estudiadas (P5 y P15), sólo los FGFRs parecen estar involucrados en su acción al ser igual el efecto inhibitor de SU5402 y SB402451, con lo que FGFR1 se presenta como el principal candidato ya que es el único FGFR capaz de interactuar con esta proteína de ECM (Hu et al., 2009).

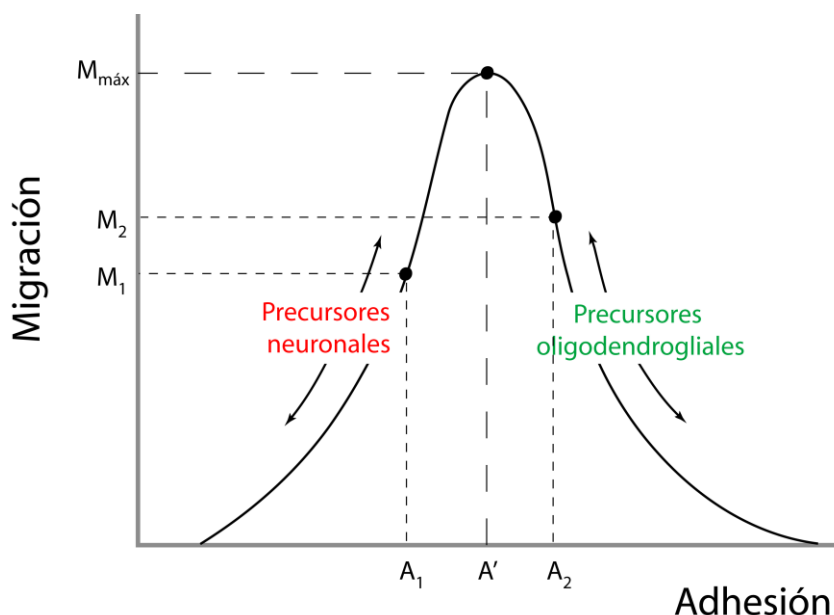


Figura 39. Gráfico en el que se modeliza la relación entre adhesión y migración.

En este sentido, los datos obtenidos con los experimentos de adhesión y quimiotaxis a partir del modelo de sobreexpresión de anosmina-1 en ratón, sugieren un papel adicional de esta proteína en la migración de neuroblastos mediante uniones homofílicas entre anosmina-1 (A1-A1). Así, la interacción entre la anosmina-1 que sobreexpresan las células endógenamente y la añadida de modo exógeno al fondo del pocillo de la placa de cultivo, podría explicar en parte la mayor motilidad de estas células observada en los experimentos de *video time-lapse*, como se representa esquemáticamente en la **Figura 38**. También han sido descritas interacciones homofílicas de anosmina-1 (mediante un mecanismo independiente de FGFR1) en precursores de oligodendrocitos del nervio óptico durante el desarrollo, hecho que disminuye significativamente su migración (Bribián et al., 2008). La interrelación entre los procesos de adhesión y migración podría representarse como una campana de Gauss, en la que se alcanza una migración máxima ($M_{\text{máx}}$) para un determinado grado de adhesión (A_1). En consecuencia, niveles de adhesión distintos de A_1 resultarían en migraciones subóptimas. Por tanto, los efectos opuestos de las interacciones homofílicas entre anosmina-1 para ambos tipos celulares podrían explicarse situando a los precursores neuronales y oligodendrogiales a cada lado de la curva, respectivamente, de modo que una variación en su adhesividad dé lugar a una respuesta inversa de su motilidad en cada tipo celular (**Figura 39**).

En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos concomitantes de FGF2 y anosmina-1 ayudarían, junto con otros mecanismos ya comentados con anterioridad, a que los neuroblastos postmitóticos inicien su migración por la RMS hacia el BO. Este hecho convierte a anosmina-1 en una de las pocas moléculas identificadas hasta la fecha que determina el inicio de la salida de los neuroblastos desde la SVZ antes de que la RMS adquiera su conformación madura (Peretto et al., 2005; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002). Sin embargo, tampoco podemos descartar que la secreción de anosmina-1 por parte de los neuroblastos en migración sobre los que siguen detrás en formación de cadenas ejerza un efecto paracrino quimioatractivo, en este proceso de aporte de nuevas neuronas al BO, crucial para el mantenimiento de la función olfativa en roedores (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996).

La sobreexpresión de anosmina-1 altera la densidad de las distintas interneuronas del BO

Una vez en el BO, los neuroblastos completan su proceso de diferenciación celular y se convierten en interneuronas maduras que difieren en su localización, morfología, y propiedades neuroquímicas y sinápticas, haciendo de este heterogéneo grupo de células un modulador clave de las aferencias provenientes del EO y de la señal de salida del BO a la corteza (Batista-Brito et al., 2008; Kosaka y Kosaka, 2005; Parrish-Aungst et al., 2007). Las interneuronas granulares y de la capa plexiforme externa son principalmente GABAérgicas, mientras que las periglomerulares pueden subdividirse

en tres grupos apenas solapantes: dopaminérgicas (TH⁺), GABAérgicas (CB⁺ y CR⁺) o glutamatérgicas (Neurog2⁺, Tbr2⁺ y Tbr1⁺; Brill et al., 2009; Kosaka y Kosaka, 2005; Lledo et al., 2008; Parrish-Aungst et al., 2007). Esta diversidad en las poblaciones neuronales del BO refleja un considerable grado de heterogeneidad, ya existente en los neuroblastos en la SVZ, cuya identidad está determinada antes de comenzar su migración (ver Introducción para más detalles; Baker et al., 2001; De Marchis et al., 2004; Hack et al., 2005; Jankovski y Sotelo, 1996; Kohwi et al., 2005; Lledo et al., 2008; Young et al., 2007). Aunque se ha propuesto que esta diversidad funcional de las nuevas interneuronas sirve para determinadas tareas y propósitos específicos, poco se conoce en detalle al respecto. Por ejemplo, se sabe que las CPG-TH⁺ reciben aferencias sinápticas directas desde el EO (Kosaka y Kosaka, 2005) y que su regulación activa ha sido relacionada con problemas olfativos severos en diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, el mal de Alzheimer y la demencia frontotemporal (Hawkes, 2003; Kovacs, 2004; Mundiñano et al., 2011). En estas complejas enfermedades, los distintos datos disponibles apoyan la idea de que la pérdida de la función olfativa no es consecuencia de un daño en el EO, sino más bien el resultado de diversas anomalías en el BO, tales como la acumulación de depósitos de proteínas o cambios en la densidad de interneuronas, que conducirían a una disfunción en el procesamiento de la señal sensorial en el BO (Hawkes, 2003; Kovacs, 2004; Mundiñano et al., 2011). Igualmente, se ha propuesto que el incremento en la actividad dopaminérgica en el BO podría ser un mecanismo compensatorio derivado del desequilibrio en otros sistemas de neurotransmisores, lo que podría contribuir a la disfunción olfativa que desarrollan estos pacientes (Mundiñano et al., 2011).

Por el contrario, modelos de depresión en roedores basados en la privación sensitiva olfativa aguda muestran una drástica caída en la expresión de neuronas dopaminérgicas en el BO (Briñón et al., 2001; Song y Leonard, 2005), aunque esto también pudiera deberse a una descompensación general del sistema de neurotransmisores, no sólo en el BO sino en el conjunto del SNC, causada por la depresión general del animal. En este sentido, el tratamiento con antidepresivos en estos modelos de depresión ha mostrado un incremento general en la expresión de FGF2, lo que ha situado a este factor de crecimiento en el punto de mira como un objetivo potencial para la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos (Jarosik et al., 2011). Otros autores han descrito que la falta de FGFR1 bajo el control del promotor TH da lugar a una disminución significativa en el número de interneuronas TH⁺ (Klejbor et al., 2006). En consecuencia, el aumento del número de células dopaminérgicas que hemos observado en el BO de ratones transgénicos (+/A1 y A1/A1), podría ser consecuencia directa de una inducción de la diferenciación hacia un fenotipo dopaminérgico actividad de FGFR1, causada por la sobreexpresión de anosmina-1. En este mismo sentido apuntan otros datos recientes, que muestran que la falta de anosmina-1 en pez cebra conduce a una reducción específica del número de interneuronas TH⁺ y GABAérgicas en el BO (Yanicostas et al., 2009).

Por otro lado, un trabajo reciente ha demostrado que la diferenciación neuronal inducida por FGF2 en células progenitoras embrionarias de origen humano está mediada por la vía de señalización por debajo de ERK1/2 (Yoo et al., 2011). Otros trabajos *in vitro* han descrito que las neuronas corticales glutamatérgicas, tras una breve exposición a FGF2, sufren un cambio en su programación celular que induce un fenotipo GABAérgico y un linaje oligodendroglial, mediante la activación de los factores de transcripción Mash1 y Olig2 (Bithell et al., 2008). Además, otros trabajos en ratones carentes de FGFR1, como consecuencia de mutaciones condicionales restringidas a precursores neurales telencefálicos ($Fgfr1^{f/f;hGfapCre}$), han descrito una disminución en el número de interneuronas corticales GABAérgicas (PV^+ y CB^+ ; Muller-Smith et al., 2008).

Igualmente, cabe la posibilidad de que estos aumentos en el número de determinadas poblaciones neuronales del BO en nuestros ratones transgénicos, se puedan deber en parte a una activación selectiva de ciertos factores de transcripción presentes en regiones concretas de la SVZ acordes con la segregación zonal (ver Introducción para más detalles). Por ello, podría resultar muy interesante su estudio con el fin de determinar con mayor detalle las causas moleculares de las alteraciones observadas.

Por tanto, nuestros datos obtenidos en ratones homocigotos que presentan una mayor densidad de interneuronas GABAérgicas (TH^+ , PV^+ y $NeuN^+$) en las tres capas del BO (glomerular, plexiforme externa y granular) donde se integran las células provenientes de la SVZ, parecen concordar con estos resultados descritos por otros grupos de investigación y podrían explicar las deficiencias olfativas mostradas por los ratones de sobreexpresión de anosmina-1.

La neurogénesis y su significado funcional

El sistema olfativo presenta un interés general para la neurobiología que va más allá de la función sensorial y de relación con el entorno, que se debe a la neurogénesis, un proceso que persiste excepcionalmente en el individuo adulto. Este hecho fue descrito inicialmente en las NSOs, las cuales se generan a partir de las células basales en el EO (Graziadei y Monti Graziadei, 1985). Las neuronas de proyección (mitrales y empenachadas) se presentan como elementos estables o constantes para las NSOs, que envían fibras a los glomérulos del BO, y para las interneuronas recién llegadas a las capas glomerular y granular, en continua renovación. Así, la neurogénesis en el sistema olfativo reemplaza las aferencias al BO y las interneuronas que modulan la eferencias enviadas a corteza. Desde este punto de vista, el BO representa una de las regiones más plásticas del SNC, al nivel, si no más, del propio giro dentado del hipocampo (Zhao et al., 2008). ¿Por qué se produce esta continua renovación? Para encontrar una respuesta a esta pregunta, hay que tener en cuenta que las únicas células nerviosas expuestas directamente al medio externo son las NSOs. Se ha propuesto la posibilidad de que los elementos nocivos e infecciosos inhalados causen una continua pérdida de

estas células, actuando en consecuencia, bien directa o indirectamente, como una fuerza promotora de su reemplazamiento y renovación. En cambio, las explicaciones para la neurogenesis de la SVZ, que produce las interneuronas del BO, parecen menos claras y varían, desde un reajuste o afinamiento continuo en respuesta a la mencionada renovación de las aferencias sensoriales olfativas primarias, hasta un mecanismo de seguridad para contener el mayor riesgo de infección por la entrada de agentes infecciosos a través de la cavidad nasal, pasando por la implicación de las feromonas en el reconocimiento materno y en el cambiante establecimiento de lazos afectivos a lo largo de la vida (Ache y Young, 2005; Dulac y Torello, 2003; Hawkes, 2003; Kovacs, 2004; Lledo et al., 2008). En cualquier caso, puesto que la neurogénesis es un proceso muy conservado entre especies, parece complicado negar que las nuevas interneuronas desempeñan un papel relevante en el comportamiento animal, a pesar de que, aproximadamente, la mitad de ellas muera al llegar al BO (Yokoyama et al., 2011; Zhao et al., 2008).

El presente trabajo muestra que los efectos biológicos de la señalización de FGFR1, inducida por la sobreexpresión sostenida de anosmina-1, son congruentes en cierto modo con algunos previamente descritos para FGF2 (Bithell et al., 2008; Kuhn et al., 1997; Yoo et al., 2011). Junto con ello, los datos obtenidos sugieren una cierta correlación gradual entre el creciente nivel de sobreexpresión de anosmina-1 en los ratones transgénicos (+/A1 y A1/A1) y el grado de severidad del fenotipo descrito.

En resumen, este estudio aporta datos acerca del papel de anosmina-1 en la formación temprana de la RMS y sugiere la relevancia de su complementariedad con FGF2 en este aspecto del desarrollo del sistema olfativo. Hasta la fecha no se ha estudiado el sistema SVZ-RMS en pacientes del síndrome de Kallmann, aunque las alteraciones en la proliferación y migración de precursores de interneuronas desde la SVZ, podrían ayudar a explicar la anosmia de dichos pacientes, aislada o en combinación con otros defectos descritos en el sistema olfativo (Dodé y Hardelin, 2009). Además, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de anosmina-1 incrementa fuertemente la neurogénesis en el nicho germinal periventricular en ratones adultos y confirma el papel de dicha proteína en la migración de neuroblastos de SVZ, añadiendo nuevos datos acerca de sus propiedades adhesivas y, en consecuencia, del papel de anosmina-1 en la motilidad celular. El conjunto de estos efectos conduce a cambios en la densidad de distintas poblaciones de interneuronas del BO, lo que produce un desequilibrio entre las células excitadoras e inhibitoras que, a su vez, podría ser la causa de las alteraciones en el comportamiento olfativo que hemos observado, relacionadas con la percepción-procesamiento de información y la memoria olfativa a corto plazo. Estos complejos procesos analizados no son exclusivamente olfativos y otras estructuras neurogénicas, como el hipocampo, también podrían estar involucradas en la memoria olfativa, especialmente si se tiene en cuenta la ya conocida implicación de FGFR1 en la neurogénesis del giro dentado (Ohkubo et al., 2004; Shin et

al., 2004; Zhao et al., 2008; Zhao et al., 2007). Actualmente, los efectos de la sobreexpresión de anosmina-1 en la neurogénesis del hipocampo son objeto de estudio en nuestro grupo. Por último, es importante mencionar que una causa común de anosmia se debe a alteraciones en las proteínas que regulan el correcto funcionamiento de los cilios de las NSOs del EO (Kulaga et al., 2004). A pesar de no haber encontrado cambios anatómicos aparentes en el EO de los ratones transgénicos de sobreexpresión de anosmina-1 y, teniendo en cuenta las alteraciones que hemos descrito en las células ciliadas de la SVZ en animales A1/A1, cabría esperar similares efectos en el EO de estos ratones, por lo que serán estudiados en detalle en un futuro inmediato.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos propuestos, los resultados obtenidos con el presente trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Las proteínas anosmina-1, FGF2 y FGFR1 se expresan de forma dinámica en el área neurogénica comprendida desde la SVZ al bulbo olfativo a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal.
2. Anosmina-1 y FGF2 intervienen en la migración de los neuroblastos de la SVZ, sobre los que ejercen un papel quimioatrayente y motogénico, respectivamente. Estos efectos se producen antes de que la RMS adquiera su aspecto maduro y se cuentan, por tanto, entre las moléculas que antes, cronológicamente, actúan en esta importante ruta de migración neuronal.
3. Los efectos de anosmina-1 y FGF2 sobre la migración de los neuroblastos se producen, principalmente, a través de FGFR1, aunque no podemos descartar que otros receptores participen de forma adicional en el proceso.
4. Anosmina-1 no tiene un efecto significativo en la proliferación de los diferentes tipos celulares de la SVZ, mientras que FGF2 estimula potentemente la división de células de estirpe astrogial, en exclusiva.
5. La sobreexpresión de anosmina-1 en una cepa de ratón transgénico produce, en el adulto, alteraciones morfológicas de aquellas células de la SVZ que mayor cantidad de FGFR1 expresan: las células endimarias y las células progenitoras neurales.
 - a. El análisis ultraestructural al microscopio electrónico revela alteraciones en la morfología y organización de los cilios de las células endimarias de la SVZ.
 - b. Dicha sobreexpresión de anosmina-1 induce de modo global la proliferación en la SVZ, expandiendo significativamente la población de células precursoras neurales que dan lugar, en última instancia, a los precursores de interneuronas que migran al bulbo olfativo a lo largo de la RMS.
6. El cuerpo basal del cilio primario de las células progenitoras neurales de la SVZ expresa FGFR1, lo que bien pudiera explicar el funcionamiento de esta estructura como antena mecano y quimiorreceptora.

7. La sobreexpresión de anosmina-1 modifica las propiedades adhesivas de los neuroblastos de la SVZ y promueve su motilidad intrínseca.
8. La conjunción del incremento de proliferación en la SVZ y de la mayor capacidad migratoria de los neuroblastos, ambos derivados de la sobreexpresión de anosmina-1 en el SNC adulto, conducen a un aumento del número de interneuronas inhibitoras que llegan desde la SVZ al bulbo olfativo.
9. La sobreexpresión de anosmina-1 produce un desequilibrio en la densidad final de las distintas poblaciones de interneuronas GABAérgicas en el bulbo olfativo adulto, que son: granulares NeuN⁺, PV⁺ de la capa plexiforme externa y periglomerulares dopaminérgicas TH⁺.
10. La sobreexpresión de anosmina-1 genera alteraciones en el comportamiento olfativo de los ratones transgénicos, afectándose tanto la percepción/procesamiento de la información en el bulbo olfativo, como la memoria olfativa a corto plazo.

REFERENCIAS

Literatura Citada

- Ache BW, Young JM. 2005. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48:417-430.
- Aguirre A, Gallo V. 2004. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24:10530-10541.
- Ahmed EI, Zehr JL, Schulz KM, Lorenz BH, DonCarlos LL, Sisk CL. 2008. Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat Neurosci* 11:995-997.
- Akai J, Halley PA, Storey KG. 2005. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev* 19:2877-2887.
- Alcantara S, Ruiz M, de Castro F., Soriano E, Sotelo C. 2000. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127:1359-1372.
- Alonso M, Ortega-Perez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM. 2008. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *J Neurosci* 28:11089-11102.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Álvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Anderson L, Burnstein RM, He X, Luce R, Furlong R, Foltynie T, Sykacek P, Menon DK, Caldwell MA. 2007. Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential in vivo. *Exp Neurol* 204:512-524.
- Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C. 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 7:1319-1328.
- Ardouin O, Legouis R, Fasano L, vid-Watine B, Korn H, Hardelin J, Petit C. 2000. Characterization of the two zebrafish orthologues of the KAL-1 gene underlying X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Mech Dev* 90:89-94.
- Arikawa E, Quellhorst G, Han Y, Pan H, Yang J. 2011. RT2 profilerTM PCR Arrays: Pathway-focused gene expression profiling with qRT-PCR. Technical article, SuperArray Bioscience Corporation.
- Arisi GM, Foresti ML, Mukherjee S, Shapiro LA. 2012. The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis. *Behav Brain Res* 227:356-362.
- Ayari B, Landoulsi A, Soussi-Yanicostas N. 2012. Localization and characterization of kal 1.a and kal 1.b in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Bull* 88:345-353.
- Ayari B, Soussi-Yanicostas N. 2007. FGFR1 and anosmin-1 underlying genetically distinct forms of Kallmann syndrome are co-expressed and interact in olfactory bulbs. *Dev Genes Evol* 217:169-175.
- Baird A, Klagsbrun M. 1991. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells* 3:239-243.
- Baker H, Liu N, Chun HS, Saino S, Berlin R, Volpe B, Son JH. 2001. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb. *J Neurosci* 21:8505-8513.
- Balmer CW, LaMantia AS. 2005. Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway. *Dev Dyn* 234:464-481.
- Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G. 2008. The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28:3966-3975.
- Baum MJ. 2012. Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. *Front Neuroanat* 6:20.
- Baum MJ, Kelliher KR. 2009. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol* 71:141-160.
- Beech RD, Cleary MA, Treloar HB, Eisch AJ, Harrist AV, Zhong W, Greer CA, Duman RS, Picciotto MR. 2004. Nestin promoter/enhancer directs transgene expression to precursors of adult generated periglomerular neurons. *J Comp Neurol* 475:128-141.
- Belluscio L, Koentges G, Axel R, Dulac C. 1999. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97:209-220.
- Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL, Muller U. 2007. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci* 27:2704-2717.
- Berghard A, Buck LB. 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J Neurosci* 16:909-918.
- Berrier AL, Yamada KM. 2007. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-573.

- Bithell A, Finch SE, Hornby MF, Williams BP. 2008. Fibroblast growth factor 2 maintains the neurogenic capacity of embryonic neural progenitor cells in vitro but changes their neuronal subtype specification. *Stem Cells* 26:1565-1574.
- Bonneh-Barkay D, Wiley CA. 2009. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol* 19:573-585.
- Bordey A. 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle* 5:722-728.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolín P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976-5980.
- Brennan PA, Zufall F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444:308-315.
- Bribián A, Barallobre MJ, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. 2006. Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 33:2-14.
- Bribián A, Esteban PF, Clemente D, Soussi-Yanicostas N, Thomas JL, Zalc B, de Castro F. 2008. A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev Neurobiol* 68:1503-1516.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Gotz M. 2009. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524-1533.
- Briñón JG, Crespo C, Weruaga E, Martínez-Guijarro FJ, Aijón J, Alonso JR. 2001. Bilateral olfactory deprivation reveals a selective noradrenergic regulatory input to the olfactory bulb. *Neuroscience* 102:1-10.
- Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187.
- Buck LB. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611-618.
- Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, Meneses J, Pedersen R, Axel R, Rubenstein JL. 1998. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* 21:1273-1282.
- Bulow HE, Berry KL, Topper LH, Peles E, Hobert O. 2002. Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene *kal-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6346-6351.
- Calvo CF, Fontaine RH, Soueid J, Tammela T, Makinen T, Faro-Cervello C, Bonnaud F, Miguez A, Benhaim L, Xu Y, Barallobre MJ, Moutkine I, Lyytikka J, Tatlisumak T, Pytowski B, Zalc B, Richardson W, Kessaris N, Garcia-Verdugo JM, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL. 2011. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev* 25:831-844.
- Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, Piva F, Rugari EI, Maggi R. 2004. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (*KAL1*) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet* 13:2781-2791.
- Caric D, Raphael H, Viti J, Feathers A, Wancio D, Lillien L. 2001. EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* 128:4203-4216.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, varez-Buylla A, Lledo PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Cave JW, Baker H. 2009. Dopamine systems in the forebrain. *Adv Exp Med Biol* 651:15-35.
- Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 20:1446-1457.
- Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM. 1994. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem* 269:11620-11627.
- Chung WC, Matthews TA, Tata BK, Tsai PS. 2010. Compound deficiencies in multiple fibroblast growth factor signalling components differentially impact the murine gonadotrophin-releasing hormone system. *J Neuroendocrinol* 22:944-950.
- Chung WC, Tsai PS. 2010. Role of fibroblast growth factor signaling in gonadotropin-releasing hormone neuronal system development. *Front Horm Res* 39:37-50.
- Clemente D, Esteban PF, Del V, I, Bribián A, Soussi-Yanicostas N, Silva A, de Castro F. 2008. Expression pattern of Anosmin-1 during pre- and postnatal rat brain development. *Dev Dyn* 237:2518-2528.
- Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. 2011. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 31:14899-14909.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, varez-Buylla A. 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091-1097.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437:1018-1021.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer

- P, Scheff S, . 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455-459.
- Creuzet S, Schuler B, Couly G, Le Douarin NM. 2004. Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4843-4847.
- de Castro F. 2009. Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. *Front Neurosci* 3:52.
- de Castro F, Bribián A. 2005. The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49:227-241.
- De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, Hsieh YC, Garzotto D, Peretto P, Fasolo A, Puche AC, Rossi F. 2007. Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *J Neurosci* 27:657-664.
- De Marchis S, Fasolo A, Shipley M, Puche A. 2001. Unique neuronal tracers show migration and differentiation of SVZ progenitors in organotypic slices. *J Neurobiol* 49:326-338.
- De Marchis S, Temoney S, Erdelyi F, Bovetti S, Bovolin P, Szabo G, Puche AC. 2004. GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Eur J Neurosci* 20:1307-1317.
- de Morsier G. 1954. Studies in cranio-encephalic dysraphia. I. Agenesis of the olfactory lobe (lateral telencephaloschisis) and of the callous and anterior commissures (median telencephaloschisis); olfacto-genital dysplasia. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 74:309-361.
- Del Bigio MR. 2010. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55-73.
- del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. 1992. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2:305-310.
- Del Punta K, Puche A, Adams NC, Rodriguez I, Mombaerts P. 2002. A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 35:1057-1066.
- Delfino-Machín M, Lunn JS, Breitkreuz DN, Akai J, Storey KG. 2005. Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* 132:4273-4283.
- Dellovade TL, Hardelin JP, Soussi-Yanicostas N, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M, Petit C. 2003. Anosmin-1 immunoreactivity during embryogenesis in a primitive eutherian mammal. *Brain Res Dev Brain Res* 140:157-167.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673-1677.
- Dityatev A, Fellin T. 2008. Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol* 4:235-247.
- Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. 2010. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* 33:503-512.
- Dodé C, Hardelin JP. 2009. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:139-146.
- Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De PA, Le DN, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le TD, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, emarre-van de WH, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33:463-465.
- Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toubanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP. 2006. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2:e175.
- Doetsch F, Álvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Duke VM, Winyard PJ, Thorogood P, Soothill P, Bouloux PM, Woolf AS. 1995. KAL, a gene mutated in Kallmann's syndrome, is expressed in the first trimester of human development. *Mol Cell Endocrinol* 110:73-79.
- Dulac C, Axel R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206.
- Dulac C, Torello AT. 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4:551-562.
- Dulac C, Wagner S. 2006. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet* 40:449-467.

- Eggenschwiler JT, Anderson KV. 2007. Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:345-373.
- Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada KM. 2012. Extracellular Matrix Protein Anosmin Promotes Neural Crest Formation and Regulates FGF, BMP, and WNT Activities. *Dev Cell* 23:305-316.
- Evans MJ, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Baker GL, Murphy AE, Nishio SJ, Sannes PL, Plopper CG. 2002. Fibroblast growth factor-2 during postnatal development of the tracheal basement membrane zone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1263-L1270.
- Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. 2008. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 118:2822-2831.
- Fleischer J, Breer H. 2010. The Grueneberg ganglion: a novel sensory system in the nose. *Histol Histopathol* 25:909-915.
- Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. 2001. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:493-503.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Graziella PM, Camerino G, Ballabio A. 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536.
- Frinchi M, Bonomo A, Trovato-Salinaro A, Condorelli DF, Fuxe K, Spampinato MG, Mudo G. 2008. Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 447:20-25.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
- Furusho M, Kaga Y, Ishii A, Hebert JM, Bansal R. 2011. Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *J Neurosci* 31:5055-5066.
- Gálvez-Contreras AY, Gonzalez-Castaneda RE, Luquin S, Gonzalez-Perez O. 2012. Role of fibroblast growth factor receptors in astrocytic stem cells. *Curr Signal Transduct Ther* 7:81-86.
- Garcia-Marques J, De Carlos JA, Greer CA, Lopez-Mascaraque L. 2010. Different astroglia permissivity controls the migration of olfactory bulb interneuron precursors. *Glia* 58:218-230.
- García-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57:765-775.
- Garzotto D, Giacobini P, Crepaldi T, Fasolo A, De MS. 2008. Hepatocyte growth factor regulates migration of olfactory interneuron precursors in the rostral migratory stream through Met-Grb2 coupling. *J Neurosci* 28:5901-5909.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA. 1995. Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol* 361:249-266.
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:21-33.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Gianola S, de Castro F, Rossi F. 2009. Anosmin-1 stimulates outgrowth and branching of developing Purkinje axons. *Neuroscience* 158:570-584.
- Gill JC, Moenter SM, Tsai PS. 2004. Developmental regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by fibroblast growth factor signaling. *Endocrinology* 145:3830-3839.
- Goings GE, Sahni V, Szele FG. 2004. Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res* 996:213-226.
- Goldman SA, Zukhar A, Barami K, Mikawa T, Niedzwiecki D. 1996. Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings in vitro and in vivo. *J Neurobiol* 30:505-520.
- González-Martínez D, Kim SH, Hu Y, Guimond S, Schofield J, Winyard P, Vannelli GB, Turnbull J, Bouloux PM. 2004. Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. *J Neurosci* 24:10384-10392.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA. 1985. Neurogenesis and plasticity of the olfactory sensory neurons. *Ann N Y Acad Sci* 457:127-142.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, varez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.
- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 19:3287-3297.

- Guimond SE, Turnbull JE. 1999. Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. *Curr Biol* 9:1343-1346.
- Guirao B, Joanny JF. 2007. Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophys J* 92:1900-1917.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, . 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379-394.
- Gunning P, Leavitt J, Muscat G, Ng SY, Kedes L. 1987. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4831-4835.
- Haberly LB, Price JL. 1977. The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129:152-157.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5:939-945.
- Hack MA, Saghatelian A, de CA, Pfeifer A, shery-Padan R, Lledo PM, Gotz M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-872.
- Hagg T. 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* 28:589-595.
- Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, Ellison DW, Gilbertson RJ, Álvarez-Buylla A. 2009. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med* 15:1062-1065.
- Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Álvarez-Buylla A. 2008. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11:277-284.
- Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Verney C, Schwanzel-Fukuda M, yer-Le LC, Petit C. 1999. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn* 215:26-44.
- Hasegawa H, Ashigaki S, Takamatsu M, Suzuki-Migishima R, Ohbayashi N, Itoh N, Takada S, Tanabe Y. 2004. Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J Neurosci* 24:8711-8719.
- Hawkes C. 2003. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Mov Disord* 18:364-372.
- Hayes FJ, Seminara SB, Crowley WF, Jr. 1998. Hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27:739-63, vii.
- Hebert JM, Lin M, Partanen J, Rossant J, McConnell SK. 2003. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 130:1101-1111.
- Herrada G, Dulac C. 1997. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90:763-773.
- Herz J, Chen Y. 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7:850-859.
- Hu H. 1999. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703-711.
- Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16:735-743.
- Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Kim SH, Bouloux PM. 2004. Cross-talk of anosmin-1, the protein implicated in X-linked Kallmann's syndrome, with heparan sulphate and urokinase-type plasminogen activator. *Biochem J* 384:495-505.
- Hu Y, Guimond SE, Travers P, Cadman S, Hohenester E, Turnbull JE, Kim SH, Bouloux PM. 2009. Novel mechanisms of fibroblast growth factor receptor 1 regulation by extracellular matrix protein anosmin-1. *J Biol Chem* 284:29905-29920.
- Hu Y, Yu H, Shaw G, Pask AJ, Renfree MB. 2011. Kallmann syndrome 1 gene is expressed in the marsupial gonad. *Biol Reprod* 84:595-603.
- Hudson ML, Kinnunen T, Cinar HN, Chisholm AD. 2006. C. elegans Kallmann syndrome protein KAL-1 interacts with syndecan and glypican to regulate neuronal cell migrations. *Dev Biol* 294:352-365.
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.
- Hynes RO. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219.
- Ihrle RA, Álvarez-Buylla A. 2011. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70:674-686.
- Inta D, Alfonso J, von EJ, Kreuzberg MM, Meyer AH, van Hooft JA, Monyer H. 2008. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20994-20999.
- Iwema CL, Fang H, Kurtz DB, Youngentob SL, Schwob JE. 2004. Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 24:356-369.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Álvarez-Buylla A. 2006. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187-199.

- Jankovski A, Garcia C, Soriano E, Sotelo C. 1998. Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:3853-3868.
- Jankovski A, Sotelo C. 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371:376-396.
- Jarosik J, Legutko B, Werner S, Unsicker K, von Bohlen und HO. 2011. Roles of exogenous and endogenous FGF-2 in animal models of depression. *Restor Neurol Neurosci* 29:153-165.
- Jian B, Nagineini CN, Meleth S, Grizzle W, Bland K, Chaudry I, Raju R. 2009. Anosmin-1 involved in neuronal cell migration is hypoxia inducible and cancer regulated. *Cell Cycle* 8:3770-3776.
- Kakita A, Goldman JE. 1999. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23:461-472.
- Kallmann FJ, Schoenfeld WA, Barrera SE. 1944. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* XLVIII:203-236.
- Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, varez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL, Sawamoto K. 2010. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67:213-223.
- Kang N, Baum MJ, Cherry JA. 2009. A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J Neurosci* 29:624-634.
- Kang N, Baum MJ, Cherry JA. 2011. Different profiles of main and accessory olfactory bulb mitral/tufted cell projections revealed in mice using an anterograde tracer and a whole-mount, flattened cortex preparation. *Chem Senses* 36:251-260.
- Kawamata H, Furihata T, Omotehara F, Sakai T, Horiuchi H, Shinagawa Y, Imura J, Ohkura Y, Tachibana M, Kubota K, Terano A, Fujimori T. 2003. Identification of genes differentially expressed in a newly isolated human metastasizing esophageal cancer cell line, T.Tn-AT1, by cDNA microarray. *Cancer Sci* 94:699-706.
- Kawauchi S, Shou J, Santos R, Hebert JM, McConnell SK, Mason I, Calof AL. 2005. Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse. *Development* 132:5211-5223.
- Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C. 2007. Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS Biol* 5:e300.
- Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Iikawa-Hirasawa E, Efrid JT, Mercier F. 2007. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 25:2146-2157.
- Kim HG, Kurth I, Lan F, Melicani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC. 2008. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 83:511-519.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Álvarez-Buylla A. 1999. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19:2171-2180.
- Klejbor I, Myers JM, Hausknecht K, Corso TD, Gambino AS, Morys J, Maher PA, Hard R, Richards J, Stachowiak EK, Stachowiak MK. 2006. Fibroblast growth factor receptor signaling affects development and function of dopamine neurons - inhibition results in a schizophrenia-like syndrome in transgenic mice. *J Neurochem* 97:1243-1258.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, varez-Buylla A. 2005. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003.
- Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JL, varez-Buylla A. 2007. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 27:6878-6891.
- Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, Roysam B, Shen Q, Temple S. 2010. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell* 7:163-173.
- Kornack DR, Rakic P. 2001. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4752-4757.
- Kosaka K, Kosaka T. 2005. synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80:80-90.
- Kovacs T. 2004. Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* 3:215-232.
- Kramar EA, Bernard JA, Gall CM, Lynch G. 2003. Integrins modulate fast excitatory transmission at hippocampal synapses. *J Biol Chem* 278:10722-10730.

- Kriegstein A, Álvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Kriegstein AR, Gotz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Kulaga HM, Leitch CC, Eichers ER, Badano JL, Lesemann A, Hoskins BE, Lupski JR, Beales PL, Reed RR, Katsanis N. 2004. Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet* 36:994-998.
- Larriva-Sahd J. 2008. The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *J Comp Neurol* 510:309-350.
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de CF, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM. 2009. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4:e7017.
- Le Magueresse C, Alfonso J, Bark C, Eliava M, Khrulev S, Monyer H. 2012. Subventricular zone-derived neuroblasts use vasculature as a scaffold to migrate radially to the cortex in neonatal mice. *Cereb Cortex* 22:2285-2296.
- Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R. 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 23:397-418.
- Legouis R, Hardelin JP, Leuilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le PD, Cohen D, Caterina D, . 1991. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423-435.
- Legouis R, Lievre CA, Leibovici M, Lapointe F, Petit C. 1993. Expression of the KAL gene in multiple neuronal sites during chicken development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2461-2465.
- Liu WL, Shipley MT. 1994. Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol* 346:541-558.
- Lledo PM, Lagier S. 2006. Adjusting neurophysiological computations in the adult olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:443-453.
- Lledo PM, Merkle FT, Álvarez-Buylla A. 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.
- Lois C, Álvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- López-Mascaraque L, de Castro F. 2002. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ* 9:1279-1286.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196:395-406.
- Lumsden AG, Davies AM. 1986. Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature* 323:538-539.
- Luo M, Katz LC. 2004. Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Curr Opin Neurobiol* 14:428-434.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Lutz B, Kuratani S, Rugarli EI, Wawersik S, Wong C, Bieber FR, Ballabio A, Eichele G. 1994. Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum Mol Genet* 3:1717-1723.
- Macatee TL, Hammond BP, Arenkiel BR, Francis L, Frank DU, Moon AM. 2003. Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development* 130:6361-6374.
- Maestre de San Juan A. 1856. Teratología: falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía una atrofia congénita de los testículos y el miembro viril. *El Siglo Médico*, Madrid 3:211-221.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Maric D, Fiorio PA, Chang YH, Barker JL. 2007. Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors. *J Neurosci* 27:1836-1852.
- Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, Seminara SB, Pitteloud N, Zhou QY, Crowley WF, Jr. 2011. The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. *Endocr Rev* 32:225-246.
- Martínez-Marcos A. 2009. On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol* 87:21-30.
- Mason HA, Ito S, Corfas G. 2001. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21:7654-7663.

- Mason I. 2007. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci* 8:583-596.
- Matsunami H, Buck LB. 1997. A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90:775-784.
- McLean JH, Shipley MT. 1988. Postmitotic, postmigrational expression of tyrosine hydroxylase in olfactory bulb dopaminergic neurons. *J Neurosci* 8:3658-3669.
- McQuiston AR, Katz LC. 2001. Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 86:1899-1907.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.
- Merchán P, Bribián A, Sanchez-Camacho C, Lezameta M, Bovolenta P, de Castro F. 2007. Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci* 36:355-368.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-188.
- Meredith M, Marques DM, O'Connell RO, Stern FL. 1980. Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science* 207:1224-1226.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Álvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-384.
- Mihara M, Yoshida Y, Tsukamoto T, Inada K, Nakanishi Y, Yagi Y, Imai K, Sugimura T, Tatematsu M, Ushijima T. 2006. Methylation of multiple genes in gastric glands with intestinal metaplasia: A disorder with polyclonal origins. *Am J Pathol* 169:1643-1651.
- Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H, Álvarez-Buylla A. 2010a. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J Vis Exp*.
- Mirzadeh Z, Han YG, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2010b. Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci* 30:2600-2610.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. 1991. The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1:221-229.
- Miyamichi K, Serizawa S, Kimura HM, Sakano H. 2005. Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:3586-3592.
- Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, Hubbard SR. 1998. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J* 17:5896-5904.
- Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J. 1997. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276:955-960.
- Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
- Mohedano-Moriano A, de IR-P, Saiz-Sanchez D, Ubeda-Banon I, Pro-Sistiaga P, de Moya-Pinilla M, Martinez-Marcos A. 2012. Centrifugal telencephalic afferent connections to the main and accessory olfactory bulbs. *Front Neuroanat* 6:19.
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Banon I, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A. 2007. Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 25:2065-2080.
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Banon I, de IR-P, Saiz-Sanchez D, Martinez-Marcos A. 2008. V1R and V2R segregated vomeronasal pathways to the hypothalamus. *Neuroreport* 19:1623-1626.
- Mombaerts P. 2004. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14:31-36.
- Mombaerts P. 2006. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713-737.
- Monfils MH, Driscoll I, Melvin NR, Kolb B. 2006. Differential expression of basic fibroblast growth factor-2 in the developing rat brain. *Neuroscience* 141:213-221.
- Mudo G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K. 2007. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience* 145:470-483.
- Muller-Smith K, Fagel DM, Stevens HE, Rabenstein RL, Maragnoli ME, Ohkubo Y, Picciotto MR, Schwartz ML, Vaccarino FM. 2008. Deficiency in inhibitory cortical interneurons associates with hyperactivity in fibroblast growth

- factor receptor 1 mutant mice. *Biol Psychiatry* 63:953-962.
- Mundiñano IC, Caballero MC, Ordonez C, Hernandez M, DiCauda C, Marcilla I, Erro ME, Tunon MT, Luquin MR. 2011. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 122:61-74.
- Murase S, Horwitz AF. 2002. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22:3568-3579.
- Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, Masurkar AV, Igarashi KM, Mori K, Chen WR. 2010. Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. *Front Neural Circuits* 4.
- Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. 2004. Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 91:2532-2540.
- Neugebauer JM, Amack JD, Peterson AG, Bisgrove BW, Yost HJ. 2009. FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* 458:651-654.
- Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923-1927.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van EA, Sotelo C, Chedotal A. 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24:1497-1506.
- Nissant A, Bardy C, Katagiri H, Murray K, Lledo PM. 2009. Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:728-730.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.
- Nusse R. 2003. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130:5297-5305.
- O'Leary DD. 1989. Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci* 12:400-406.
- Ohkubo Y, Uchida AO, Shin D, Partanen J, Vaccarino FM. 2004. Fibroblast growth factor receptor 1 is required for the proliferation of hippocampal progenitor cells and for hippocampal growth in mouse. *J Neurosci* 24:6057-6069.
- Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, Aida K, Nagahama Y. 2006. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147:1076-1084.
- Ono J, Harada K, Hasegawa T, Sakurai K, Kodaka R, Tanabe Y, Tanaka J, Igarashi T, Nagai T, Okada S. 1994. Central nervous system abnormalities in chromosome deletion at 11q23. *Clin Genet* 45:325-329.
- Ornitz DM. 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22:108-112.
- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292-15297.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5672-5677.
- Pantazopoulos H, Woo TU, Lim MP, Lange N, Berretta S. 2010. Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67:155-166.
- Paratcha G, Ibanez CF, Ledda F. 2006. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci* 31:505-514.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F. 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J* 23:4495-4505.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. 2007. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501:825-836.
- Pencea V, Luskin MB. 2003. Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 463:402-418.
- Peretto P, Giachino C, Aimar P, Fasolo A, Bonfanti L. 2005. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* 487:407-427.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42:9-21.
- Peterson DA. 1999. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. *Methods* 18:493-507.
- Petreanu L, Álvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Philpot BD, Foster TC, Brunjes PC. 1997. Mitral/tufted cell activity is attenuated and

- becomes uncoupled from respiration following naris closure. *J Neurobiol* 33:374-386.
- Pignatelli A, Ackman JB, Vigetti D, Beltrami AP, Zucchini S, Belluzzi O. 2009. A potential reservoir of immature dopaminergic replacement neurons in the adult mammalian olfactory bulb. *Pflugers Arch* 457:899-915.
- Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF, Jr. 2007. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17447-17452.
- Prestoz L, Chatzopoulou E, Lemkine G, Spassky N, Lebras B, Kagawa T, Ikenaka K, Zalc B, Thomas JL. 2004. Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction. *Neuron Glia Biol* 1:73-83.
- Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de LL, Martinez A, Delgado-Garcia JM, Soriano E. 2010. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 30:4636-4649.
- Raju R, Dalakas MC. 2005. Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biological validation of clinically relevant genes. *Brain* 128:1887-1896.
- Rakic P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- Raymond K, Deugnier MA, Faraldo MM, Glukhova MA. 2009. Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol* 21:623-629.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
- Reuss B, von Bohlen und HO. 2003. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139-157.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565-4574.
- Robertson A, MacColl GS, Nash JA, Boehm MK, Perkins SJ, Bouloux PM. 2001. Molecular modelling and experimental studies of mutation and cell-adhesion sites in the fibronectin type III and whey acidic protein domains of human anosmin-1. *Biochem J* 357:647-659.
- Rodríguez I, Feinstein P, Mombaerts P. 1999. Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97:199-208.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317:372-376.
- Rousselot P, Lois C, Álvarez-Buylla A. 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351:51-61.
- Rugarli EI, Di SE, Hilliard MA, Arbucci S, Ghezzi C, Faccioli A, Coppola G, Ballabio A, Bazzicalupo P. 2002. The Kallmann syndrome gene homolog in *C. elegans* is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching. *Development* 129:1283-1294.
- Rugarli EI, Lutz B, Kuratani SC, Wawersik S, Borsani G, Ballabio A, Eichele G. 1993. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet* 4:19-26.
- Ryba NJ, Tirindelli R. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19:371-379.
- Saghatelian A, de CA, Schachner M, Lledo PM. 2004. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:347-356.
- Saino-Saito S, Sasaki H, Volpe BT, Kobayashi K, Berlin R, Baker H. 2004. Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 479:389-398.
- Saucier D, Astic L. 1986. Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Res Bull* 16:455-462.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Álvarez-Buylla A. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.
- Scalia F, Winans SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161:31-55.
- Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, Roper SN, Steindler DA. 2005. Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9353-9358.
- Schmechel DE, Rakic P. 1979. Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 277:303-305.
- Schoenfeld TA, Clancy AN, Forbes WB, Macrides F. 1994. The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: Receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Res Bull* 34:183-210.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an

- inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6:311-326.
- Seth P, Koul N. 2008. Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci* 33:405-421.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shin DM, Korada S, Raballo R, Shashikant CS, Simeone A, Taylor JR, Vaccarino F. 2004. Loss of glutamatergic pyramidal neurons in frontal and temporal cortex resulting from attenuation of FGFR1 signaling is associated with spontaneous hyperactivity in mice. *J Neurosci* 24:2247-2258.
- Shipley MT, Adamek GD. 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12:669-688.
- Singla V, Reiter JF. 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313:629-633.
- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-4188.
- Song C, Leonard BE. 2005. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:627-647.
- Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chedotal A, Petit C. 2002. Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109:217-228.
- Soussi-Yanicostas N, Faivre-Sarrailh C, Hardelin JP, Levilliers J, Rougon G, Petit C. 1998. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci* 111 (Pt 19):2953-2965.
- Soussi-Yanicostas N, Hardelin JP, Arroyo-Jiménez MM, Ardouin O, Legouis R, Levilliers J, Traincard F, Betton JM, Cabanie L, Petit C. 1996. Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *J Cell Sci* 109 (Pt 7):1749-1757.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Stachowiak MK, Maher PA, Stachowiak EK. 2007. Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol* 26:811-826.
- Stenman J, Toresson H, Campbell K. 2003. Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci* 23:167-174.
- Strotmann J. 2001. Targeting of olfactory neurons. *Cell Mol Life Sci* 58:531-537.
- Strotmann J, Levai O, Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H. 2004. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci* 24:7754-7761.
- Strotmann J, Wanner I, Helfrich T, Beck A, Breer H. 1994. Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurones in the rat nasal cavity. *Cell Tissue Res* 278:11-20.
- Suárez R, García-González D, de Castro F. Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. *In press*.
- Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG. 2005. Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:1089-1100.
- Suzuki SO, Goldman JE. 2003. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci* 23:4240-4250.
- Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Fu KK, Richman JM. 2008. FGF signals from the nasal pit are necessary for normal facial morphogenesis. *Dev Biol* 318:289-302.
- Tavazoie M, Van d, V, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279-288.
- Tengara S, Tominaga M, Kamo A, Taneda K, Negi O, Ogawa H, Takamori K. 2010. Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycoprotein encoded by the X-linked Kallmann syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 58:64-71.
- Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. 1999. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev* 13:3136-3148.
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, Doetschman T, Coffin JD, Wyland JJ, Hung YT. 1999. Changes in cerebral

- cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* 2:848.
- Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Birnbaum D, Basilico C, Jaye M, Alitalo K. 1992. Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J* 11:4273-4280.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S. 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11:951-966.
- Vogl TJ, Stemmler J, Heye B, Schopohl J, Danek A, Bergman C, Balzer JO, Felix R. 1994. Kallman syndrome versus idiopathic hypogonadotropic hypogonadism at MR imaging. *Radiology* 191:53-57.
- Wachowiak M, Shipley MT. 2006. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411-423.
- Waclaw RR, Allen ZJ, Bell SM, Erdelyi F, Szabo G, Potter SS, Campbell K. 2006. The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron* 49:503-516.
- Wagner S, Gresser AL, Torello AT, Dulac C. 2006. A multireceptor genetic approach uncovers an ordered integration of VNO sensory inputs in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 50:697-709.
- Whitlock KE, Smith KM, Kim H, Harden MV. 2005. A role for *foxd3* and *sox10* in the differentiation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the zebrafish *Danio rerio*. *Development* 132:5491-5502.
- Whitman MC, Fan W, Relat L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516:94-104.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Winans SS, Scalia F. 1970. Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science* 170:330-332.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Wray S, Grant P, Gainer H. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8132-8136.
- Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. 1999. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331-336.
- Yang M, Crawley JN. 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit*.
- Yanicostas C, Ernest S, Dayraud C, Petit C, Soussi-Yanicostas N. 2008. Essential requirement for zebrafish anosmin-1a in the migration of the posterior lateral line primordium. *Dev Biol* 320:469-479.
- Yanicostas C, Herbomel E, Dipietromaria A, Soussi-Yanicostas N. 2009. Anosmin-1a is required for fasciculation and terminal targeting of olfactory sensory neuron axons in the zebrafish olfactory system. *Mol Cell Endocrinol* 312:53-60.
- Yokoyama TK, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Sakano H, Mori K, Yamaguchi M. 2011. Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71:883-897.
- Yoo YD, Huang CT, Zhang X, Lavaute TM, Zhang SC. 2011. Fibroblast growth factor regulates human neuroectoderm specification through ERK1/2-PARP-1 pathway. *Stem Cells* 29:1975-1982.
- Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, Maione L, Tosca L, Sarfati J, Brioude F, Esteve B, Briand-Suleau A, Brisset S, Goossens M, Tachdjian G, Guiochon-Mantel A. 2012. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod* 27:1460-1465.
- Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD. 2007. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:8286-8296.
- Zaghloul NA, Brugmann SA. 2011. The emerging face of primary cilia. *Genesis* 49:231-246.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao M, Li D, Shimazu K, Zhou YX, Lu B, Deng CX. 2007. Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry* 62:381-390.
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM. 2004. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse

brain subventricular zone. *Dev Neurosci* 26:181-196.

Zufall F. 2005. Connexins and olfactory synchronicity: toward the olfactory code. *Neuron* 46:693-694.

ANEXOS

Anexo I: Material suplementario

Vídeo 1.- Migración de precursores neuronales en cultivos de explantes de SVZ de ratas de edad E17.

Vídeo 2.- Migración de precursores neuronales en cultivos de explantes de SVZ de ratas de edad E17 en presencia de FGF2.